



# Facteurs épidémiologiques contribuant à l'adaptation des populations de *Leptosphaeria maculans* aux résistances spécifiques de *Brassica napus*: dispersion des pycnidiospores et des ascospores et progression systémique du champignon

Renaud Travadon

## ► To cite this version:

Renaud Travadon. Facteurs épidémiologiques contribuant à l'adaptation des populations de *Leptosphaeria maculans* aux résistances spécifiques de *Brassica napus*: dispersion des pycnidiospores et des ascospores et progression systémique du champignon. Ecologie, Environnement. Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes, 2008. Français. NNT: . tel-00333477

**HAL Id: tel-00333477**

**<https://theses.hal.science/tel-00333477>**

Submitted on 23 Oct 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° Ordre :  
N° Série :

# THESE

*Pour obtenir le grade de*

**Docteur**

De

L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES

Mention : Biologie et Agronomie

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Renaud TRAVADON**

le 9 juillet 2008

Facteurs épidémiologiques contribuant à l'adaptation des populations de *Leptosphaeria maculans* aux résistances spécifiques de *Brassica napus* : dispersion des pycnidiospores et des ascospores et progression systémique du champignon

*Directeur de thèse : **Hortense BRUN***

*Directeurs de thèse associés : **Lydia BOUSSET, Ivan SACHE***

INRA, Agrocampus Rennes, Univ. Rennes 1, UMR1099 Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes, F-35653 Le Rheu

Ecole doctorale Université Rennes I / Agrocampus Rennes : Vie–Agro-Santé

Devant le jury :

M. MANZANARES DAULEUX  
C. NEEMA  
J. SHYKOFF  
X. PINOCHET  
H. BRUN  
L. BOUSSET  
I. SACHE

MC, Agrocampus Rennes  
Professeur, AgroParisTech  
DR, CNRS Paris XI  
Direction scientifique, CETIOM  
IR, INRA Rennes  
CR, INRA Rennes  
CR, INRA Grignon

Examineur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Directeur de thèse associé  
Directeur de thèse associé



N° Ordre :  
N° Série :

# THESE

*Pour obtenir le grade de*

**Docteur**

De

L'ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE RENNES

Mention : Biologie et Agronomie

*Présentée et soutenue publiquement par*

**Renaud TRAVADON**

le 9 juillet 2008

Facteurs épidémiologiques contribuant à l'adaptation des populations de  
*Leptosphaeria maculans* aux résistances spécifiques de *Brassica napus* :  
dispersion des pycnidiospores et des ascospores et progression systémique du  
champignon

*Directeur de thèse : **Hortense BRUN***

*Directeurs de thèse associés : **Lydia BOUSSET, Ivan SACHE***

INRA, Agrocampus Rennes, Univ. Rennes 1, UMR1099 Biologie des Organismes et des Populations  
appliquée à la Protection des Plantes, F-35653 Le Rheu

Ecole doctorale Université Rennes I / Agrocampus Rennes : Vie–Agro-Santé

Devant le jury :

M. MANZANARES DAULEUX  
C. NEEMA  
J. SHYKOFF  
X. PINOCHET  
H. BRUN  
L. BOUSSET  
I. SACHE

MC, Agrocampus Rennes  
Professeur, AgroParisTech  
DR, CNRS Paris XI  
Direction scientifique, CETIOM  
IR, INRA Rennes  
CR, INRA Rennes  
CR, INRA Grignon

Examineur  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Directeur de thèse associé  
Directeur de thèse associé



## Avant propos

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'UMR BIO3P du centre INRA de Rennes. Je remercie les équipes de direction successives (Didier Andrivon, Alain Sarniguet, Jean-Christophe Simon, Denis Tagu, Bruno Hervé) de m'avoir accueilli dans cette unité pour y réaliser dans de très bonnes conditions ce doctorat. Je remercie également l'INRA et la Région Bretagne qui ont financé ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement Hortense Brun, ma directrice de thèse, ainsi que Lydia Bousset et Ivan Sache, mes co-directeurs de thèse, pour leur forte implication au quotidien dans ce travail. Je remercie particulièrement Lydia Bousset pour ses conseils judicieux, sa disponibilité et sa réactivité, pour m'avoir fait confiance, ce fut un grand plaisir de travailler à tes côtés. Je remercie très sincèrement Ivan Sache. Merci Ivan pour ton investissement dans l'encadrement de ma thèse, tes déplacements réguliers en Bretagne m'ont toujours été très précieux et tes grandes qualités pédagogiques ont largement contribué à ma formation de chercheur.

J'adresse mes remerciements aux membres de mon comité de pilotage, Christian Lannou, Pierre-Olivier Cheptou, Cyril Dutech et Jean-Pierre Masson, pour les discussions enrichissantes lors de mes comités. Je remercie particulièrement Cyril Dutech et Jean-Pierre Masson qui m'ont fait profiter de leurs connaissances tout au long de ces trois années.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail : Maria Manzanares, Jaqui Shykoff, Claire Neema et Xavier Pinochet.

Je remercie tous les membres de l'équipe « Résistance » pour leur sympathie et le soutien qu'ils portent à tous les thésards de l'équipe. Je remercie tout particulièrement Bruno Marquer pour son aide et sa disponibilité, Magali Ermel et Anne-Laure Besnard, pour leur bonne humeur et leurs conseils, et Arnaud Ribulé, membre à mi-temps de l'équipe ou « intermittent de la recherche », c'est selon, pour sa contribution à ce travail. Je remercie aussi Regine Delourme et Anne-Marie Chèvre pour les discussions enrichissantes tenues lors de nos réunions.

Tous les thésards de l'unité ont participé à la bonne ambiance de travail durant ma thèse, mais les principaux artisans de cette bonne humeur sont sans conteste Natacha et Matthieu, mes collègues et surtout amis de bureau, avec qui j'ai passé de très bons moments. Je remercie aussi Josselin, mon 'guide spirituel' qui m'a transmis savoir et autorité, Gaël, entre autres pour m'avoir initié au stade rennais et au poker, et Ronan, ce noble Duc néanmoins ami. Un grand merci à Marie, Virgil, Laure, Mathieu, Christelle, Julie, Morgane, Emilie, Yannick et Gaël, pour leur sympathie.

Merci à tous les membres de l'unité pour l'ambiance conviviale qui y règne, et merci particulièrement à Lionel L, Anne-Yvonne, Stéphanie, Morgane, Kévin, Nathalie, François, Stéphane, Jean-Marie, Henry, Lionel R pour tous les bons moments passés ensemble.

Enfin je remercie ma famille et mes amis pour tous leurs encouragements depuis ces trois dernières années, et depuis bien plus encore.



## Table des matières

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1</b>	
<b>Synthèse bibliographique .....</b>	<b>3</b>
1. La relation plante hôte-agent pathogène.....	3
1.1 Rappels généraux .....	3
1.2 Résistance des plantes et pathogénicité des agents pathogènes .....	4
2. Coévolution entre les plantes hôtes et les agents pathogènes .....	6
2.1 Coévolution en populations naturelles .....	6
2.2 Evolution des populations pathogènes en système agricole.....	9
3. Durabilité des résistances variétales et stratégies de gestion.....	11
3.1 Association de gènes non contournables .....	12
3.2 Limitation de la pression de sélection sur la parcelle .....	14
3.3 Déploiement spatio-temporel des résistances : réseau de parcelles .....	15
4. Estimation des distances de dispersion : approches directes et indirectes .....	15
4.1 Caractéristiques générales de la dispersion .....	15
4.2 Mesures de la dispersion.....	16
5. Le pathosystème <i>Leptosphaeria maculans</i> / colza .....	18
5.1 Le colza.....	18
5.2 Le Phoma du colza dû à <i>Leptosphaeria maculans</i> .....	19
5.3 Méthodes de lutte contre le Phoma du colza .....	21
5.4 Cycle épidémique et stratégies de gestion des résistances du colza.....	23
6. La reproduction sexuée : facteur adaptatif chez <i>L. maculans</i> .....	25
6.1 Reproduction sexuée et capacités de dispersion de <i>L. maculans</i> .....	25
6.2 Reproduction sexuée et recombinaison méiotique .....	25
6.3 Changements géniques et chromosomiques associés à la méiose.....	26
7. La reproduction sexuée chez <i>L. maculans</i> : causes potentielles d'échec.....	28
8. Problématique et objectifs de ce travail de thèse.....	30
<b>Chapitre 2</b>	
<b>Dispersion par la pluie des pycnidiospores de <i>L. maculans</i>.....</b>	<b>33</b>
PARTIE I : Etude en conditions contrôlées .....	33
1. Problématique .....	33
2. Matériel et Méthodes.....	34
2.1 Générateur de gouttes incidentes.....	34
2.2 Simulateur de pluie .....	35
3. Résultats .....	35





3.1 Mise en évidence expérimentale du phénomène de « splashing ».....	35
3.2 Gradient de dispersion des pycnidiospores .....	36
3.3 Gradient de dispersion de la maladie.....	36
4. Conclusions - Discussion .....	36
5. Perspectives.....	37
PARTIE II : Approche complémentaire au champ.....	38
Article 1: Splash dispersal of <i>Leptosphaeria maculans</i> pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape.....	41

### Chapitre 3

#### Progression systémique de *L. maculans* jusqu'au collet de la plante de colza, site de la reproduction sexuée .....

1. Problématique .....	57
2. Matériel et Méthodes.....	58
2.1 Matériel végétal et inoculation.....	58
2.2 Notation des nécroses au collet et détection du champignon .....	58
3. Résultats .....	59
3.1 Mise au point d'une méthode en conditions contrôlées permettant l'expression de nécrose au collet à partir d'inoculations sur cotylédons .....	59
3.2 Influence du nombre de points d'infection sur cotylédons et de la résistance polygénique sur l'incidence et la sévérité des nécroses au collet .....	59
3.3 Compétition entre souches durant la progression systémique du champignon.....	60
4. Conclusions - Discussion .....	60
5. Perspectives.....	62
Article 2: Systemic growth of <i>Leptosphaeria maculans</i> from cotyledons to hypocotyle in oilseed rape: influence of the number of infection sites, of intraspecific competition and of host polygenic resistance .....	63

### Chapitre 4

#### Estimation indirecte des distances de dispersion des ascospores de *L. maculans* .....

1. Problématique .....	79
2. Matériel et Méthodes.....	80
2.1 Echantillonnage, extraction des ADN fongiques et amplification des marqueurs minisatellites .....	80
2.2 Analyse des données.....	81
3. Résultats .....	82
3.1 Diversité génétique au sein des populations.....	82
3.2 Déséquilibre de liaison .....	82



3.3 Diversité génétique entre les populations .....	82
4. Conclusions - Discussion .....	83
Article 3: High gene flow and random mating in <i>Leptosphaeria maculans</i> populations in France .....	84
<b>Chapitre 5</b>	
<b>Discussion générale</b> .....	<b>100</b>
 <b>Références bibliographiques</b> .....	 <b>115</b>
Annexe 1 : Manuscrit d'un chapitre d'ouvrage	
Emission des pycnidiospores de <i>L. maculans</i> .....	128
Annexe 2 : Manuscrit d'un chapitre d'ouvrage	
Progression systémique du champignon dans la plante .....	134
Annexe 3 : Liste des publications scientifiques et communications associées au travail de thèse.....	141



## Introduction générale

Les systèmes de production agricole se trouvent actuellement face à un défi majeur, l'augmentation constante de la demande alimentaire mondiale. L'intensification des cultures et la limitation des pertes constituent actuellement les principaux moyens d'accroître la productivité de l'agriculture (Semal & Lepoivre, 2003). Au cours des dernières décennies les rendements des productions végétales ont sensiblement augmenté suite à l'emploi de nouvelles variétés, l'utilisation d'engrais, l'irrigation et la lutte contre les plantes adventices, les maladies et les ravageurs. Cependant, les pertes de rendement observées malgré la mise en place de mesures de protection (culturales, génétiques, biologiques ou chimiques), s'élèvent encore à plus de 40 % dans les pays industrialisés et à plus de 50 % dans les pays en développement (Semal & Lepoivre, 2003). De plus, l'utilisation systématique des produits phytosanitaires est remise en question, avec la prise de conscience croissante des risques qu'ils peuvent générer pour l'environnement, voire pour la santé humaine (Aubertot *et al.*, 2005).

Une méthode alternative à l'utilisation de pesticides consiste à sélectionner et déployer des plantes résistantes. Malheureusement, les exemples de contournement de ces résistances génétiques dues à l'adaptation des populations pathogènes sont nombreux. Dans une perspective de systèmes de production viables et respectueux des équilibres naturels, de nouvelles stratégies doivent être déployées pour limiter les pressions de sélection sur les agents pathogènes. Ces stratégies doivent prendre en compte la structure des populations pathogènes et les mécanismes qui sont source de variabilité génétique (Brown, 2006). La connaissance du potentiel évolutif des agents pathogènes permet d'optimiser l'utilisation des gènes de résistance ou de pesticides en maximisant leur durée de vie et en minimisant les pertes causées par les pertes d'efficacité de ces méthodes de lutte (McDonald & Linde, 2002).

Chez le champignon ascomycète *Leptosphaeria maculans*, agent du Phoma du colza, la reproduction sexuée confère une forte capacité d'adaptation aux résistances spécifiques de l'hôte. Les travaux rapportés dans cette thèse portent sur les mécanismes épidémiologiques relatifs à la reproduction sexuée chez *L. maculans* et débutent par une synthèse bibliographique présentant les concepts de résistance des plantes et de pouvoir pathogène. Les processus de coévolution entre les agents pathogènes et les plantes hôtes nous éclaireront ensuite sur les capacités d'adaptation des agents pathogènes en systèmes agricoles. La durabilité des résistances variétales sera alors définie et les phénomènes de contournement des résistances y seront présentés. Les différentes actions possibles pour



optimiser l'efficacité des résistances variétales seront alors présentées, puis *L. maculans*, le modèle d'étude des travaux entrepris durant cette thèse, sera présenté. Nous verrons ensuite dans quelle mesure la reproduction sexuée influence le potentiel adaptatif de ce champignon hétérothallique, puis quelles sont les causes possibles d'un échec de la reproduction sexuée. Enfin, cette synthèse bibliographique se conclura par une présentation de la problématique générale de la thèse et de ses objectifs.





## **Synthèse bibliographique**

### **1. La relation plante hôte-agent pathogène**

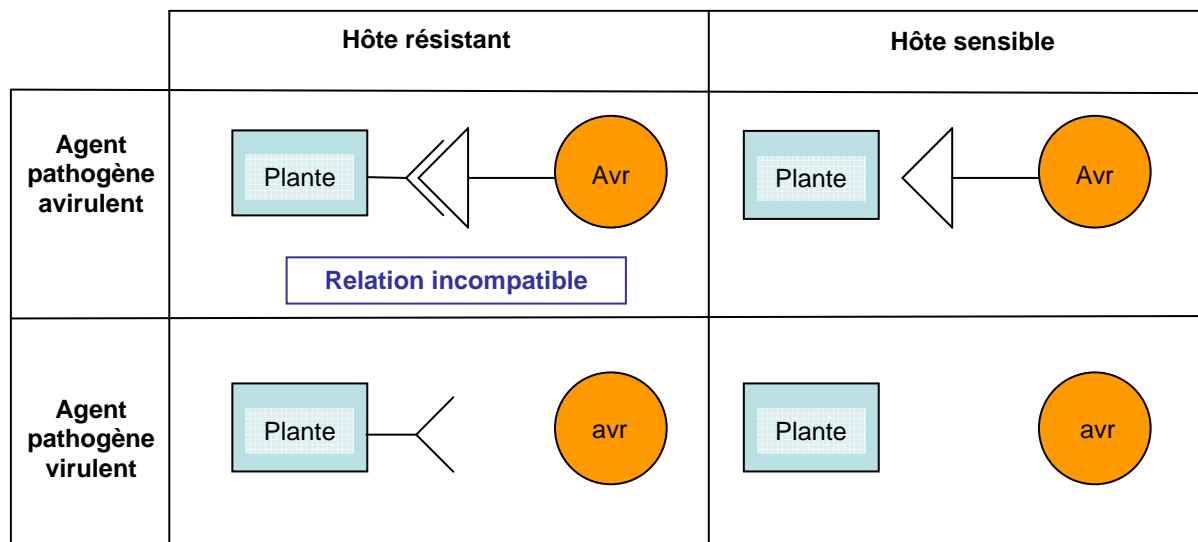
#### ***1.1 Rappels généraux***

Van der Plank (1963) a formalisé la génétique de la résistance des plantes face aux agressions parasitaires en définissant deux concepts explicatifs du pouvoir pathogène : la virulence, qui est la faculté que possède un agent pathogène d'attaquer un hôte, et l'agressivité qui est la quantité de maladie que cet agent pathogène peut induire. A ces deux composantes du pouvoir pathogène, il a associé deux types de résistances caractérisant le comportement de l'hôte : la résistance verticale opposée à la virulence et la résistance horizontale opposée à l'agressivité.

Le processus d'infection d'une plante par un agent pathogène, champignon, virus ou bactérie, est très dépendant de l'environnement. Lorsqu'un agent pathogène est placé au contact d'une plante dans des conditions environnementales favorables, deux relations sont possibles : la relation compatible, lorsque la multiplication du parasite sur l'hôte est active et lui permet de coloniser tout ou partie de l'hôte, et la relation incompatible, lorsque la croissance du parasite et donc la colonisation de l'hôte s'arrêtent précocement (Lepoivre, 2003b).

On distingue les résistances hôtes et les résistances non-hôtes. Les résistances non-hôtes des plantes s'expriment contre les agents pathogènes pour lesquels la plante ne représente pas un hôte potentiel (Heath, 2001) : tous les individus de l'espèce hôte sont résistants à toutes les populations de l'agent pathogène. La résistance non-hôte repose soit sur la présence de barrières constitutives liées aux structures morphologiques de l'hôte et relatives à l'épaisseur et à la topographie de la cuticule ou à la localisation et à la forme des stomates, soit sur des réactions de défense de la plante induites par la pénétration de l'agent pathogène. Ces mécanismes biochimiques ne semblent pas fondamentalement différents de ceux qui régissent la relation hôte dans le cas de la relation d'incompatibilité (Heath, 2001; Lepoivre, 2003b).

La résistance hôte quant à elle implique la reconnaissance entre la plante hôte et l'agent pathogène. Ce n'est qu'après cette reconnaissance que s'engagent les processus actifs de résistance ou de sensibilité, d'incompatibilité ou de compatibilité (Lepoivre, 2003b).



**Figure 1.1** : Interactions entre les agents pathogènes et les plantes hôtes dans le cadre de la relation gène-pour-gène. L'interaction est incompatible lorsque la plante possède le gène de résistance et l'agent pathogène le gène d'avirulence correspondant : les produits de ces deux gènes interagissent directement tels un modèle « récepteur/éliciteur ». Dans tous les autres cas (absence du gène de résistance et/ou absence du gène d'avirulence), l'interaction est compatible et conduit à une réaction de sensibilité chez la plante.

## **1.2 Résistance des plantes et pathogénicité des agents pathogènes**

### **1.2.1 Définitions**

Au sens large, la résistance désigne tout phénomène qui, chez un végétal, interdit ou limite le développement d'un agent pathogène. Cette propriété se traduit par un effet mesurable au niveau de la maladie et / ou de l'épidémie (Deadman, 2006).

Cependant dans ce manuscrit nous nous limiterons à un sens plus restrictif de la résistance comme effet de la plante sur l'agent pathogène et les mécanismes d'évitement et de tolérance seront brièvement abordés. L'évitement est défini comme le mécanisme qui empêche le contact cellulaire entre l'hôte et l'agent pathogène. Par exemple, certaines variétés de blé et d'orge dont les fleurs restent fermées jusqu'à ce que la pollinisation se produise évitent l'infection par les spores du champignon *Claviceps purpurea* responsable de l'ergot sur les inflorescences des céréales (Russell, 1979). La tolérance est définie par Schafer (1971) comme la capacité d'une plante à subir une maladie sans que celle-ci n'affecte le rendement ou la qualité de cette plante. La tolérance n'affecte pas la colonisation, le développement ni la reproduction de l'agent pathogène, mais elle réduit les dommages causés par l'agent pathogène.

### **1.2.2 La résistance qualitative et la virulence**

La résistance qualitative a tout d'abord été qualifiée par Van der Plank (1963) de verticale, à caractère monogénique ou oligogénique. Les gènes responsables de cette résistance sont appelés gènes majeurs de résistance (gènes R). Cette résistance est spécifique aux deux partenaires du couple plante hôte-agent pathogène et elle s'exprime après une interaction directe entre ces deux partenaires. Flor (1956, 1971) a montré chez le pathosystème lin (*Linum marginale*) – rouille du lin (*Melampsora lini*) qu'il y avait une reconnaissance spécifique entre l'hôte et l'agent pathogène : à chaque gène R qui conditionne la résistance chez l'hôte correspond un gène d'avirulence conditionnant le pouvoir pathogène chez le parasite (Figure 1.1). Cette relation « gène-pour-gène » a depuis été confirmée pour de nombreux pathosystèmes (Lepoivre, 2003b), même si dans certains cas un déterminisme plus complexe a été postulé. La résistance qualitative est également appelée totale, spécifique ou monogénique, bien que ces différents qualificatifs renvoient à des facettes différentes de l'interaction et ne soient pas équivalents.

Lorsque des symptômes de maladie apparaissent chez l'hôte, l'agent pathogène est virulent, dans le cas contraire il est avirulent. La reconnaissance entre les produits des gènes



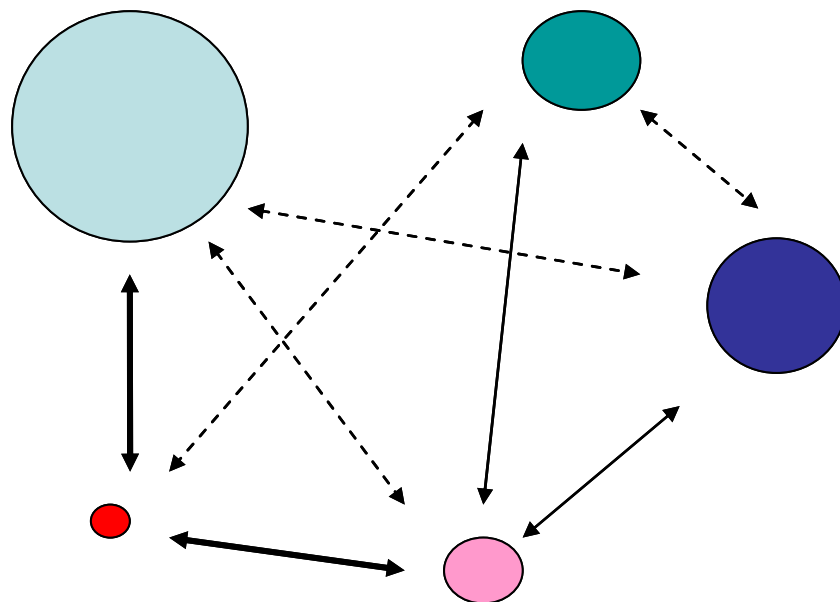
d'avirulence de l'agent pathogène et des protéines réceptrices de l'hôte codées par les gènes majeurs de résistance active une voie de signalisation métabolique qui déclenche une cascade de réactions conduisant à la mise en place de mécanismes de défense chez la plante (Struck, 2006). Chez les bactéries et les champignons phytopathogènes, les molécules élicitrices sont de nature polysaccharidique, glycoprotéique ou lipidique (Lepoivre, 2003b) et pour celles dont la séquence a été obtenue, on n'observe pas d'homologies particulières.

La relation incompatible se manifeste chez l'hôte par une réaction d'hypersensibilité qui se caractérise par la mort des cellules hôtes au site d'infection (Lepoivre, 2003b). On observe donc une réponse de type tout ou rien : l'efficacité d'infection est maximale lorsque l'agent pathogène est virulent, ou bien nulle lorsqu'il est avirulent.

### 1.2.3 La résistance quantitative et l'agressivité

De nombreuses formes de résistance hôte aux maladies ne sont pas déterminées par la relation « gène-pour-gène » mais sont gouvernées par plusieurs gènes dont les effets s'additionnent : ce type de résistance est appelée résistance quantitative (Schiff *et al.*, 2001). Les régions chromosomiques impliquées dans la résistance quantitative sont appelées « Quantitative Trait Loci » (QTL), chaque QTL étant supposé avoir un effet additif sur la résistance (Lindhout, 2002). La résistance quantitative est aussi dite partielle, générale ou polygénique, bien que ces qualificatifs ne soient pas équivalents.

Cette résistance s'exerce de manière quantitative sur la deuxième composante du pouvoir pathogène qui est l'agressivité. Gouvernée par plusieurs gènes dont les effets se cumulent, elle est très sensible aux conditions environnementales (Deadman, 2006). Au niveau du cycle de l'agent pathogène, la résistance quantitative peut provoquer une diminution d'agressivité se traduisant selon les cas par une baisse de l'efficacité d'infection, par un allongement de la période de latence (période entre l'infection et la sporulation de l'agent pathogène), ou bien par une réduction de la quantité de symptômes ou de la sporulation. À l'échelle polycyclique, la résistance quantitative entraîne un ralentissement du développement de l'épidémie dans la culture en raison de son efficacité partielle vis-à-vis de l'agent pathogène.



**Figure 1.2 :** Représentation schématique d'une métapopulation naturelle, constituée d'un réseau de populations variant par leur taille (cercles de diamètres différents) et par leur degré d'isolement (migrations régulières : flèches pleines ; migration occasionnelles : flèches pointillées). D'après Hanski, 1998.

## **2. Coévolution entre les plantes hôtes et les agents pathogènes**

Dans les communautés naturelles, les mécanismes de coévolution entre les plantes et les agents pathogènes aboutissent à des situations d'équilibre régulées par les différentes forces évolutives (Gandon *et al.*, 1996). Dans les agrosystèmes, l'intervention de l'homme sur les caractéristiques des hôtes et leurs conséquences sur les agents pathogènes ne permettent pas d'aboutir à des situations stables. Les pressions de sélection exercées par les variétés résistantes prennent le pas sur les autres forces évolutives (Mundt, 2002). Ces situations favorisent alors la sélection d'individus capables de se développer sur des variétés résistantes (McDonald & Linde, 2002). Une meilleure compréhension des mécanismes de coévolution peut donc permettre à l'homme d'élaborer des stratégies de gestion des résistances afin d'améliorer la durabilité de leur efficacité.

### **2.1 Coévolution en populations naturelles**

#### **2.1.1 Caractéristiques générales**

On parle de coévolution lorsque les évolutions de deux ou plusieurs espèces s'influencent réciproquement (Ridley, 1996). Le phénomène de coévolution est un des principaux facteurs influençant la structure des communautés biologiques ; en particulier, il modifie les niveaux de résistance et de virulence dans les systèmes hôtes-parasites (Thompson, 1998).

Les relations souvent étroites et spécifiques qu'entretiennent les parasites et leurs hôtes les rendent particulièrement susceptibles de coévoluer pas à pas de manière antagoniste. Ceci les mène à une escalade évolutive du type « course aux armements », les hôtes luttant pour résister à l'infection et les parasites luttant pour contourner ces résistances. La connaissance de l'échelle spatiale à laquelle les plantes et les agents pathogènes interagissent est cruciale pour comprendre l'évolution des structures de résistance / virulence (Thrall & Burdon, 1997).

#### **2.1.2 Métapopulations**

Les plantes hôtes sauvages sont distribuées géographiquement telle une mosaïque de sous-populations (Burdon, 1993). Cette distribution est caractéristique des pathosystèmes naturels connus qui possèdent en commun une structure spatio-temporelle de type métapopulations constituée d'un ensemble de populations isolées géographiquement les unes des autres mais pouvant échanger des individus par migration (Hanski, 1998) (Figure 1.2). A l'intérieur de la métapopulation chaque population se définit par une communauté d'individus potentiellement interféconds et situés à une localité donnée (Mayr, 1970).





Chaque population, tant les hôtes que les agents pathogènes, possède sa dynamique propre qui peut être marquée par des phases d'extinction et de recolonisation (Harrison & Hastings, 1996). La subdivision des populations de plantes hôtes augmente la probabilité de différenciation génétique des sous-populations pathogènes (Burdon, 1992).

### 2.1.3 Forces évolutives pour les agents pathogènes des plantes

Le potentiel évolutif d'une population pathogène est dépendant de la structure génétique de cette population. La structure génétique se réfère à la quantité et à la distribution de la diversité génétique au sein et parmi les populations. Cinq forces principales font évoluer la structure génétique des populations pathogènes : mutation, dérive, migration, recombinaison et sélection (McDonald & Linde, 2002). La mutation et la recombinaison sexuée sont deux mécanismes générateurs de variabilité génétique dans les populations pathogènes, alors que la dérive génétique, la migration et la sélection sont des mécanismes qui influencent la distribution de la diversité génétique dans la métapopulation (Burdon, 1993b).

La mutation provoque des changements de la séquence nucléotidique de certains gènes et peut faire apparaître de nouveaux allèles dans les populations. Ce phénomène crée des races virulentes d'agents pathogènes capables de contourner les gènes majeurs de résistance, et des races d'agents pathogènes à l'agressivité modifiée. La mutation d'un allèle d'avirulence est peu fréquente. Le nombre de mutations dépend de la taille de la population mais lorsque cette mutation est couplée à une sélection directionnelle comme le déploiement d'un gène de résistance, les mutants virulents augmentent rapidement en fréquence et causent la perte d'efficacité de cette résistance (Burdon, 1993b ; McDonald & Linde, 2002).

La recombinaison par reproduction sexuée chez les agents pathogènes des plantes est un des principaux facteurs d'adaptation locale des populations. La recombinaison n'influence pas le nombre total d'allèles présents dans une population mais elle modifie les associations d'allèles et influence ainsi la diversité génétique globale (multilocus) des individus d'une population donnée (Burdon, 1993b). Lorsque l'association de plusieurs allèles de virulence est nécessaire à l'infection d'une variété résistante, la reproduction sexuée permet de combiner ces allèles apparus indépendamment chez des génotypes différents, alors que des agents pathogènes dépourvus de reproduction sexuée ne pourront combiner ces allèles de virulence nécessaires à l'infection que par mutations successives (McDonald & Linde, 2002).

La taille de la population pathogène influence la perte d'allèles dans la population par dérive génétique. Ainsi, des populations pathogènes présentant des diminutions régulières de la



taille de leur population (effet de goulet d'étranglement, « bottleneck ») sont moins diversifiées et moins aptes à s'adapter rapidement que les populations qui présentent continuellement une grande taille de population (McDonald & Linde, 2002).

La migration, entraînant des flux de gènes ou de génotypes entre les populations d'un agent pathogène, est le phénomène qui déplace les allèles et les génotypes mutants virulents entre les populations. Dans un système de populations interconnectées, les nouvelles mutations conférant un avantage adaptatif peuvent se propager entre les populations de telle manière que cet avantage sélectif se diffuse parmi les populations pathogènes (Burdon, 1993b). Les capacités de dispersion des agents pathogènes sont déterminantes dans ce processus (Thrall & Burdon, 1999).

La sélection naturelle ou d'origine anthropique fait varier les fréquences alléliques dans les populations pathogènes et permet de sélectionner les agents pathogènes adaptés aux conditions locales qu'ils rencontrent (Thrall & Burdon, 2002).

#### 2.1.4 Dynamique spatio-temporelle et adaptation en populations naturelles

La dynamique des interactions hôte-agent pathogène en communauté naturelle est caractérisée par la diversité de la communauté hôte, par les faibles effectifs des populations pathogènes et par l'absence de synchronisation dans le temps ou dans l'espace (Burdon, 1993b).

Dans le contexte de populations naturelles structurées en métapopulations, caractérisées à la fois par de faibles effectifs et par la possibilité pour les sous-populations de connaître des phases d'extinction et de recolonisation, la migration peut jouer un rôle majeur sur l'adaptation (Kaltz & Shykoff, 1998). La diversité génétique des plantes-hôtes s'exprime souvent selon une composante spatiale, cette distribution des allèles de résistance influence la répartition des allèles de virulence des agents pathogènes et affecte leur capacité d'adaptation locale (Gandon *et al.*, 1996). Plusieurs études ont montré que les agents pathogènes étaient localement adaptés à leurs hôtes si leur capacité de migration est supérieure à celle de leur hôte (Gandon *et al.*, 1996; Delmotte *et al.*, 1999). La détection du phénomène d'adaptation locale nécessite de se placer à une échelle spatiale appropriée (Kaltz & Shykoff, 1998). Des travaux de modélisation ont aussi montré que l'adaptation locale ne dépendait pas uniquement des taux de migration, le partenaire de l'interaction possédant les taux de mutation et de migration et la taille de populations les plus élevés,



ainsi que le temps de génération le plus court étant le plus susceptible d'être adapté localement (Gandon & Michalakis, 2002).

Dans les métapopulations hôte-pathogène naturelles, les pressions de sélection ne sont pas homogènes dans chacune des sous-populations, elles peuvent être contrebalancées par des forces de sélection antagonistes. La coévolution gène pour gène nécessite le maintien du polymorphisme pour la résistance chez les hôtes et pour la virulence chez les agents pathogènes (Thompson, 1998). Dans le cas de la rouille du lin (*M. lini*) des populations sauvages (*Linum marginale*) en Australie, les races pathogènes virulentes apparaissent le plus souvent dans les communautés comportant des plantes hôtes résistantes, alors que les races avirulentes dominent les populations d'hôtes sans gènes de résistances. Cette distribution non aléatoire des populations pathogènes maintenue malgré leur grande mobilité implique que la sélection favorise les races virulentes dans les populations hôtes résistantes et les races avirulentes dans les populations hôtes sensibles. Ce modèle de coévolution exige des compromis ou « trade-off » (entre la virulence et la production de spores par exemple) pour empêcher l'augmentation de la virulence jusqu'à ce que la résistance devienne évolutivement neutre (Thrall & Burdon, 2003). Dans les communautés naturelles, les forces évolutives comme la migration, ainsi que les compromis adaptatifs (trade-off) permettent aux populations de plantes et d'agents pathogènes de se trouver dans des situations d'équilibre caractérisées par un maintien du polymorphisme.

## **2.2 Evolution des populations pathogènes en système agricole**

### **2.2.1 Caractéristiques générales**

Les systèmes agricoles sont caractérisés par de larges surfaces cultivées où la diversité génétique des plantes hôtes est très limitée ; les populations hôtes et pathogènes peuvent être de très grande taille et la migration des agents pathogènes est largement favorisée par rapport à celles des hôtes. Dans ces populations de grande taille, l'apparition d'individus mutants chez l'agent pathogène est favorisée, alors que la dérive est limitée, ce qui permet de maintenir un niveau de diversité génétique élevé et favorise ainsi la probabilité d'apparition de combinaisons d'allèles de virulence par recombinaison. Enfin, lorsqu'un gène majeur de résistance est déployé sur une très large surface, il exerce une très forte pression de sélection directionnelle, qui devient la principale force affectant les changements de fréquences alléliques dans les populations pathogènes (Hovmøller *et al.*, 1997). Les agents pathogènes virulents présents en faible proportion sont sélectionnés, leur fréquence

**Tableau 1.1** : Exemples du nombre moyen d'années observé entre le début d'utilisation de gènes de résistances et leur perte d'efficacité chez six pathosystèmes. D'après McDonald & Linde, 2002.

Organisme	Maladie	Nombre moyen d'années avant le contournement des résistances spécifiques
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	fusariose de la tomate	1
<i>Leptosphaeria maculans</i>	phoma du colza	5
<i>Melanpsora lini</i> f.sp. <i>lini</i>	rouille du lin	6
<i>Phytophthora infestans</i>	mildiou de la pomme de terre	5
<i>Venturia inaequalis</i>	tavelure du pommier	8
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	taches bactériennes sur tomates et poivrons	6

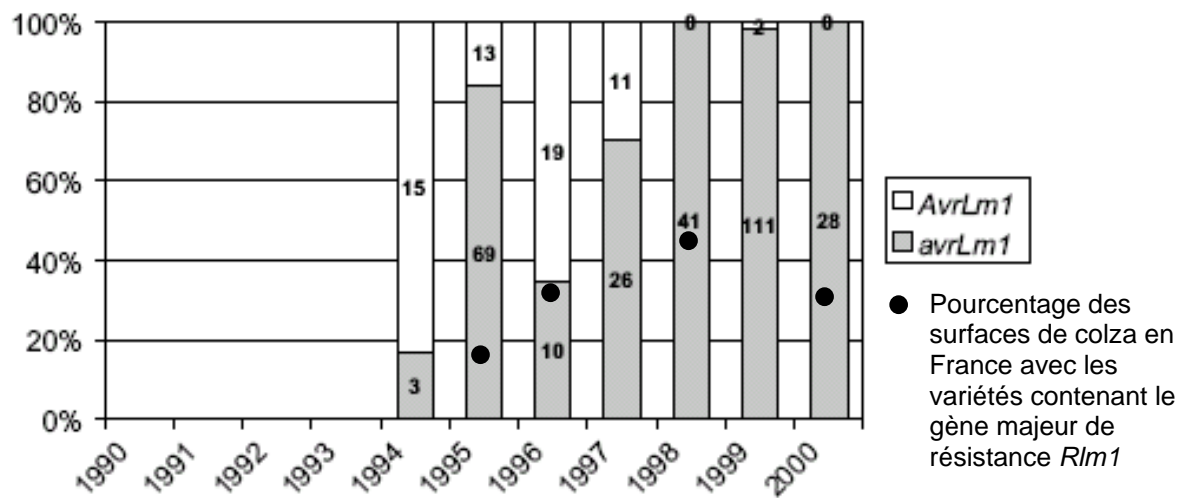
augmente jusqu'à ce que le gène majeur de résistance de l'hôte soit contourné (McDonald & Linde, 2002).

### 2.2.2 Adaptations locales en systèmes agricoles : contournements des résistances spécifiques

Les changements au sein des populations d'agents pathogènes lors des phénomènes de contournements des résistances dues à des gènes majeurs se traduisent par des cycles de « boom and bust » ou « explosion et d'extinction ». Cette dynamique cyclique commence par le large déploiement d'un gène majeur de résistance sur une grande surface, le « boom », les agents pathogènes présentant les allèles adaptés à cette pression de sélection sont sélectionnés et sont à l'origine d'une nouvelle population capable de surmonter le gène majeur de résistance, provoquant l'abandon des variétés porteuses du gène surmonté, le « bust ». Ces contournements de résistance sont causés par la sélection de mutants, de recombinants ou d'individus migrants mieux adaptés à la variété résistante et peuvent intervenir plus ou moins rapidement après le début d'utilisation des gènes de résistance, selon les agents pathogènes (Tableau 1.1; McDonald & Linde, 2002). A la différence des populations en conditions naturelles, l'intensité de la sélection est telle que les autres forces évolutives sont insuffisantes à la contre balancer. Ainsi, contrairement aux métapopulations naturelles, on n'observe pas d'équilibre stable s'opposant à l'augmentation en fréquence des individus virulents lors de l'utilisation de gènes majeurs de résistance.

Les cas de contournement des résistances spécifiques sont nombreux et illustrent parfaitement ces cycles de « boom and bust ». Pour le cas du Phoma du colza, la première démonstration de l'évolution des populations de *Leptosphaeria maculans* sous l'effet de la pression de sélection d'un gène majeur du colza est récente (1995) et expérimentale (Brun *et al.*, 2000). En 3 saisons culturales, le gène de résistance *Rlm6* a totalement perdu son efficacité face aux populations sélectionnées. Le contournement d'un gène majeur *Rlm1* utilisé dans plusieurs variétés de colza dans les conditions de la pratique agricole a été décrit par Rouxel *et al.* (2003). Entre 1990 et 2000 un suivi de la fréquence de trois phénotypes avirulents (*AvrLm1*, *AvrLm2* et *AvrLm4*) dans la population française de *L. maculans* a révélé que la majorité des souches (83 %) possédait le gène d'avirulence *AvrLm1* jusqu'à la saison de culture 1997-1998. Les variétés de colza portant le gène majeur de résistance correspondant *Rlm1* constituaient alors un moyen efficace de lutte et représentaient 44 % des emblavements en colza lors de la saison 1998-1999. Ce succès commercial des variétés possédant *Rlm1* s'est accompagné d'une forte diminution de la proportion des souches possédant le gène d'avirulence correspondant *AvrLm1* : la proportion des souches





**Figure 1.3 :** Fréquence des isolats de *L. maculans* recensés entre 1990 et 2000 et portant les gènes d'avirulence *AvrLm1* ou *avrLm1* isolés sur des variétés portant le gène majeur de résistance *Rlm1*. Le nombre d'isolats utilisés pour calculer les fréquences est indiqué dans chaque barre. L'évolution des surfaces de colza avec les variétés contenant le gène majeur *Rlm1* entre 1995 et 2000 en France est présentée. D'après Rouxel *et al.* (2003).

avirulentes (*AvrLm1*) collectées sur les variétés *Rlm1* ne dépassait pas les 13 % en 1999 et 2000 si bien que la résistance *Rlm1* avait perdu son efficacité au champ (Figure 1.3). En Australie, Li & Sivasithamparam (2003) ont également observé la perte d'efficacité d'un gène majeur de résistance issu de *B. rapa* subsp. *sylvestris* trois ans après la commercialisation de la variété contenant ce gène, présentée comme la plus résistante à *L. maculans*.

### 2.2.3 Adaptations locales en systèmes agricoles : érosion des résistances partielles

Il est difficile d'évaluer les différents niveaux d'agressivité de différents pathotypes<sup>1</sup> vis-à-vis de résistances partielles du fait de la sensibilité de ce type de résistance aux conditions environnementales. Ce type de résistance ne présente pas les cycles de « boom and bust » des gènes majeurs. Une étude théorique par modélisation indique que les agents pathogènes tendraient à surmonter ce type de résistance de manière graduelle et plus lente du fait du caractère polygénique de l'agressivité et de l'interaction différentielle moins forte entre variétés et pathotypes qui permet ainsi le maintien des individus moins agressifs (McDonald & Linde, 2002). On parle d'érosion des résistances partielles. Les études au champ consistant en la culture de variétés à résistance partielle sur de larges surfaces et sur une longue période de temps sont peu nombreuses et n'ont pas permis de révéler la non-durabilité de ce type de résistance (Lindhout, 2002). Toutefois, chez le mildiou de la pomme de terre dû à *Phytophthora infestans*, les populations françaises et marocaines sont localement adaptées aux variétés hôtes dominantes, quelle que soit le niveau de résistance partielle de la variété, soulignant l'érosion d'une résistance partielle portée par la variété Désirée au Maroc (Andriveau *et al.*, 2007). Le phénomène d'érosion des résistances partielles est difficilement observable car les populations pathogènes correspondantes (et leurs degrés d'agressivité associés) peuvent être présentes de manière très variable d'une année à l'autre en fonction des conditions environnementales (McDonald & Linde, 2002). Cependant, notre incapacité à détecter le phénomène d'érosion sur des échelles de temps courtes ne garantit pas pour autant la stabilité du système : l'évolution peut n'être que ralentie. Néanmoins, chez les parasites biotrophes dont la transmission dépend de la vie et la santé de leur hôte, l'agressivité doit être contrebalancée pour ne pas augmenter sans limite et se stabiliser autour d'une valeur intermédiaire : c'est le modèle du trade-off entre agressivité et transmission (Ebert & Bull, 2003).

## 3. Durabilité des résistances variétales et stratégies de gestion

Le concept de résistance durable se définit par le fait qu'une résistance demeure efficace contre un agent pathogène bien qu'elle soit exposée à l'agent pathogène durant une longue

<sup>1</sup> **Pathotype** : le pathotype d'un agent pathogène est défini en fonction de l'ensemble des allèles de virulence ou d'avirulence déterminés sur une gamme différentielle d'hôtes donnée.



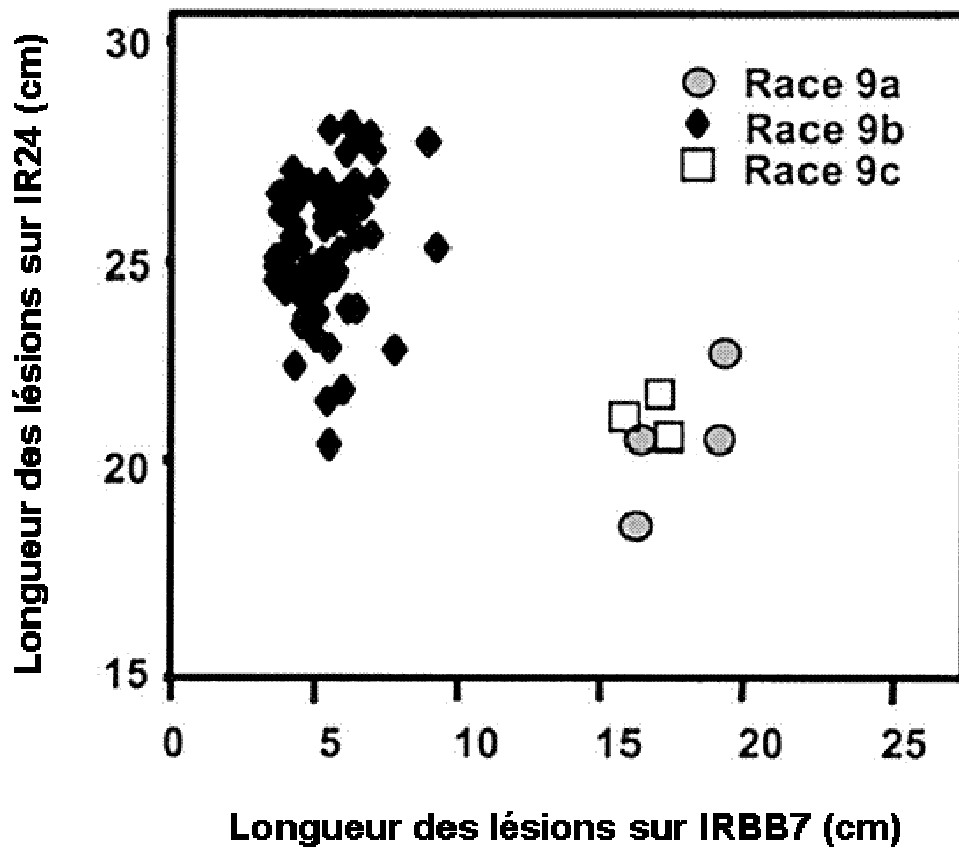
période de temps et sur une grande surface (Johnson, 1981; 1984). Il est donc primordial de prédire et de limiter le potentiel évolutif des agents pathogènes pour améliorer la durabilité des résistances variétales. Plusieurs leviers d'action sont possibles pour limiter le potentiel évolutif d'un agent pathogène. Il est d'abord possible d'exercer une forte pression de sélection par l'utilisation de gènes majeurs très efficaces (imposant une forte pénalité adaptative aux individus virulents) et/ou cumulés pour que la probabilité d'acquisition et de maintien de la/les virulence(s) correspondant(es) soit très improbable. A l'inverse, il est également envisageable de réduire la pression de sélection sur la parcelle pour limiter l'augmentation en fréquence des individus virulents. Enfin, il est possible d'exercer des pressions de sélection diversifiées dans l'espace à l'échelle d'un réseau de parcelles.

### **3.1 Association de gènes non contournables**

De nombreux gènes majeurs de résistance ont été contournés rapidement mais il existe des exemples de gènes de résistance à l'efficacité durable même déployés très largement pendant de nombreuses années (Lucas, 1998). C'est le cas du gène *mlo* utilisé depuis 1979 dans les variétés d'orge de printemps sur l'ensemble de l'Europe pour lutter contre l'oïdium de l'orge, causé par *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, et qui est toujours efficace (Schwarzbach, 1998 ; Humphry *et al.*, 2006). Le gène *Lr34* de résistance du blé à la rouille brune, causée par *Puccinia triticina*, demeure efficace depuis plus de 30 ans (Buschges *et al.*, 1997 ; Spielmeyer *et al.*, 2008).

Pour expliquer la durabilité de ces gènes de résistance, il est supposé que les mécanismes de résistance codés par ces gènes sont difficilement contournables par les agents pathogènes. Ces deux gènes majeurs de résistance ne sont pas associés à une réaction d'hypersensibilité, les mécanismes de résistance conférés par ces deux gènes semblent identiques à ceux régissant la résistance non hôte, ce qui pourrait expliquer leur caractère durable. Par exemple, le gène *mlo* empêche la pénétration du champignon pathogène en formant une barrière protectrice cellulaire ou papille au niveau des points d'infection. Les races virulentes de ce champignon contre le gène *mlo* sont présentes dans les populations naturelles et ont été dénombrées à une fréquence avoisinant les 0,1 % de la population européenne, mais aucune souche virulente de ce champignon pathogène n'a pu contourner ce mécanisme tout en gardant un avantage sélectif lui permettant de se maintenir dans les populations pathogènes (Lucas, 1998 ; Schwarzbach, 1998).

La durabilité d'un gène de résistance est fortement liée à la fréquence des mutations conférant la virulence dans les populations pathogènes et surtout à la capacité des isolats virulents de se reproduire et de transmettre leurs gènes dans la population (Lucas, 1998).



**Figure 1.4 :** Agressivité de souches de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* exprimée en longueur de lésions sur deux lignées de riz différant par la présence d'un gène majeur de résistance (*le gène Xa7* de résistance est présent dans la lignée IRBB7 et absent dans la lignée IR24). Les souches des races 9a et 9c les plus adaptées à *Xa7* étaient moins agressives sur la lignée sensible IR24 que les souches de la race 9b les moins adaptées à *Xa7*. D'après Vera Cruz *et al.*, 2000.

Les mutations surmontant les résistances sont parfois associées à des pénalités de fitness<sup>1</sup> qui ne permettent pas aux mutants virulents d'être compétitifs avec le reste de la population pathogène si bien qu'ils ne se maintiennent pas dans la population (Mundt, 1991). Il arrive donc que l'acquisition d'une virulence (ou la perte d'un gène d'avirulence) par mutation se traduise par une diminution de l'agressivité comme l'ont montré Vera Cruz *et al.* (2000) pour des pathotypes virulents de *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* responsables du flétrissement bactérien sur riz (Figure 1.4). La durabilité d'un gène de résistance est dans ce cas associée à la pénalité adaptative que confère l'acquisition de la virulence correspondante pour l'agent pathogène (Leach *et al.*, 2001) mais l'existence d'une pénalité adaptative ne constitue pas une règle générale (Mundt, 2002).

Une autre possibilité pour constituer des associations de gènes non contournables est le pyramidage de gènes majeurs de résistance (Mundt, 1991). L'efficacité de cette méthode se fonde sur la présomption que le contournement de ces nombreux gènes de résistance se produit seulement si le nouveau pathotype subit plusieurs mutations lui conférant les allèles de virulence correspondant à chacun des gènes de résistance (McDonald & Linde, 2002). Dans ce cas, la probabilité pour un agent pathogène d'acquérir les multiples virulences correspondant à ces gènes est égale au produit des probabilités d'acquérir chacune des virulences (Mundt, 1991). Cette méthode est supposée augmenter la durabilité de gènes majeurs de résistance, à conditions qu'ils ne soient pas utilisés indépendamment ce qui augmenterait les fréquences des individus présentant une virulence et n'ayant besoin d'acquérir qu'un seul allèle pour devenir multi-virulents (Kiyosawa, 1982). Cette stratégie peut se montrer satisfaisante notamment contre les agents pathogènes dépourvus de reproduction sexuée et où la mutation est la seule source de variabilité génétique comme c'est le cas de la rouille noire du blé (causée par *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*) en Australie (Lepoivre, 2003b).

Au niveau de la démographie de l'agent pathogène au cours de l'épidémie, ces stratégies consistant à exercer une pression de sélection intense sur l'agent pathogène permettent de limiter les infections primaires compatibles sur des parcelles résistantes et donc de réduire la taille initiale des populations pathogènes virulentes. La taille de la population pathogène en fin d'épidémie sera alors minimisée tout comme l'augmentation en fréquence des individus virulents dans la population pathogène régionale, cette augmentation en fréquence sera d'autant plus limitée que la pénalité adaptative associée à la perte d'avirulence sera grande. Le principal inconvénient des stratégies basées sur l'incapacité de l'agent pathogène à devenir virulent est leur absence de caractère prédictif : on observe *a posteriori* les gènes ou combinaisons de gènes qui durent plus que la moyenne sans être capables d'anticiper.

---

<sup>1</sup> **Fitness** : la contribution d'un individu au patrimoine génétique de la prochaine génération, reflétant sa capacité à survivre et à se reproduire et donc à transmettre des descendants.



### **3.2 Limitation de la pression de sélection sur la parcelle**

Ces méthodes se fondent sur l'hypothèse qu'il est possible sur une parcelle de ralentir les épidémies pour ralentir l'augmentation en fréquence des individus virulents en limitant leur avantage sélectif. Ceci est possible soit en associant plusieurs gènes majeurs (mélanges de variétés), soit en utilisant des résistances partielles.

#### **3.2.1 Mélanges de variétés**

La diversification génétique intervariétale peut se concevoir au niveau du champ de production par la culture en mélange de variétés différant par leurs gènes de résistance spécifique vis-à-vis d'un agent pathogène (Wolfe, 1985; Mundt, 2002). La diversification génétique intravariétale se fonde sur la sélection de variétés dites multilignées, mélange d'isolignées ne différant entre elles que par les gènes de résistance à un parasite défini. Ces deux types de mélanges d'individus limitent le développement des épidémies de trois façons. La diminution de la densité spatiale relative des tissus sensibles entraîne une diminution de la production d'inoculum secondaire. Les plantes résistantes intercalées entre les plantes sensibles constituent une barrière physique à la dissémination de la maladie ; en outre la densité des spores captées diminue avec la distance de la source d'infection. La contamination par des pathotypes avirulents peut induire un phénomène de prémunition contre les pathotypes virulents (Calonnec *et al.*, 1996).

L'efficacité des associations variétales à ralentir les épidémies a été mise en évidence, notamment dans les systèmes céréaliers (Finckh & Wolfe, 2006). Cependant, l'effet des associations variétales n'est possible qu'en l'absence des pathotypes multi-virulents sur l'ensemble des gènes de résistance. Il a été proposé par modélisation que les individus multivirulents peuvent être contre sélectionnés en raison d'une pénalité sur la fitness liée soit au cumul des virulences soit aux différences d'agressivité intra-pathotypes (Lannou, 2001).

#### **3.2.2 Utilisation de résistances partielles**

Les gènes de résistance partielle sont considérés comme durables sous l'hypothèse de travail qu'ils n'exercent pas de pressions sélectives différentielles vis-à-vis des pathotypes d'un agent pathogène déterminé. Ces gènes peuvent néanmoins présenter des interactions spécifiques avec certains isolats de l'agent pathogène qui risquent de conduire à une érosion de ces résistances partielles suite à l'augmentation en fréquence d'isolats particuliers (Lepoivre, 2003b). En présence d'isolats plus agressifs, l'érosion de la résistance partielle est attendue, à une vitesse cependant moins grande que la perte d'efficacité d'un gène majeur.





A ce jour, peu de données sont disponibles concernant la durabilité des résistances partielles au champ.

### **3.3 Déploiement spatio-temporel des résistances : réseau de parcelles**

La durabilité peut également être envisagée à l'échelle de la population régionale par le moyen de stratégies de déploiement des résistances dans le temps (rotations, recyclage de gènes) et dans l'espace (mosaïques de gènes). Cette méthode permet de ne pas conférer d'avantage sélectif aux isolats acquérant une virulence dans une région et se dispersant vers d'autres zones géographiques où une autre source de résistance est employée. Néanmoins, elle nécessite une bonne coordination entre l'ensemble des intervenants employant ces résistances en vue de leur diversification.

La diversification des gènes de résistance dans le temps est une stratégie employée pour les céréales d'hiver (semées à l'automne) et de printemps (semées au printemps) (Caffier & de Vallavieille-Pope, 1996). Le recyclage de gènes de résistance surmontés après quelques années est notamment envisageable dans le cas de l'oïdium de l'orge (Wolfe, 1977).

On peut également envisager d'utiliser des variétés portant des gènes de résistance différents dans des champs adjacents ou dans des zones géographiques plus vastes en fonction de la biologie de l'agent pathogène en question afin de rompre son cycle de contamination à distance à partir de sources éloignées (Finckh & Wolfe, 2006).

Le déploiement spatio-temporel des résistances permet ainsi de limiter la transmission d'inoculum virulent entre parcelles, soit en désynchronisant la production d'inoculum et la compatibilité des parcelles, soit spatialement en éloignant les sources d'inoculum des parcelles compatibles cibles. La connaissance des capacités de dispersion des agents pathogènes est alors primordiale.

## **4. Estimation des distances de dispersion : approches directes et indirectes**

### **4.1 Caractéristiques générales de la dispersion**

La dispersion est un processus impliquant le mouvement de gamètes ou d'individus, entraînant donc des échanges de génotypes et d'allèles entre populations. Au sens strict la dispersion est le mouvement effectué par un individu entre sa population de naissance et la population où il va se reproduire, mais lorsque les individus d'une espèce sont distribués de



manière continue ou bien dans le cas de très grandes populations, la dispersion est alors caractérisée par la distance parents-progéniture (Wright, 1943; Rousset, 1997).

La dispersion (dans le sens de la migration défini ci-dessus) influence donc la distribution spatiale des individus et donc des allèles. En génétique des populations la dispersion (les flux géniques) et la dérive génétique ont des effets opposés sur la variabilité génétique neutre (non soumise à la sélection), puisque la dispersion compense l'érosion de la diversité génétique que subissent les populations sous l'effet de la dérive (Wright, 1931). Dans la dynamique des métapopulations, la dispersion permet la recolonisation d'habitats après des événements d'extinction (Olivieri & Gouyon, 1997) ; la survie des métapopulations dépend ainsi fortement de la dispersion (Thrall & Burdon, 1997).

## **4.2 Mesures de la dispersion**

Les mesures de dispersion sont en général difficilement accessibles techniquement du fait des trajectoires empruntées et des interactions avec l'habitat, si bien que la dispersion est souvent décrite synthétiquement par un taux ou une distance. Si la dispersion est caractérisée par un point de départ et un point d'arrivée et identique dans toutes les directions (hypothèse d'isotropie), il est possible de déterminer la distribution des distances de dispersion (Nathan *et al.*, 2003). Cette distribution est difficile à quantifier et le plus souvent c'est un taux de dispersion qui est défini. Les taux de dispersion sont mesurés dans un contexte biologique particulier permettant de définir une distance seuil en deçà de laquelle on considère qu'il n'y a pas eu dispersion.

### **4.2.1 Mesures directes**

Les méthodes directes d'estimation de la dispersion incluent l'observation directe, les techniques de capture-marquage-recapture et la radiolocalisation (pour les animaux). Chez les agents phytopathogènes fongiques à dispersion aérienne, il existe plusieurs techniques de piégeage des spores qui font intervenir des systèmes actifs (Burkard par exemple). Ces systèmes sont efficaces lorsque la concentration en spores dans l'air est assez élevée, ce qui se produit généralement sur des distances assez faibles autour de la source de spores. En revanche ces méthodes deviennent inefficaces dès que la concentration en spores de l'air est trop faible ; dans ce cas des plantes pièges peuvent être utilisées. Ces méthodes directes ont toutefois tendance à sous-estimer la queue de dispersion des spores (distances élevées de dispersion) (Koenig *et al.*, 1996), et bien que ces événements soient relativement rares, leur impact sur la distribution spatiale des individus n'est pas forcément négligeable.



De plus les méthodes directes ne permettent pas de vérifier si le lieu de piégeage est celui d'installation définitive de l'individu.

#### 4.2.2 Mesures indirectes

En se dispersant les individus emportent avec eux des allèles qu'ils vont introduire dans leur population de destination. La distribution spatiale de la variabilité génétique peut ainsi être utilisée pour estimer les paramètres de la dispersion en se basant sur la relation établie par Wright (1931; 1943; 1951) entre le nombre de migrants et la différenciation génétique entre populations. Cette approche implique l'utilisation de marqueurs génétiques permettant d'évaluer la différenciation génétique entre populations. Dans un modèle à nombre infini de populations, la relation définie par Wright est :

$$F_{st} = 1/(4Nm + 1), (1)$$

où  $N$  est la taille efficace<sup>1</sup> d'une population,  $m$  le taux d'immigration dans cette population et  $F_{st}$  un indice de fixation qui mesure les différences de fréquences alléliques entre populations, défini comme :

$$F_{st} = (Q_w - Q_b)/(1 - Q_b)$$

où  $Q_w$  est la probabilité de tirer deux fois le même allèle dans une population et  $Q_b$  est la probabilité de tirer le même allèle dans deux populations différentes. Le  $F_{st}$  pour plusieurs loci est une moyenne pondérée par le nombre d'allèles du  $F_{st}$  calculé pour un locus. Le  $F_{st}$  peut être interprété comme la part de variance des fréquences alléliques due aux différences entre populations (Wright, 1951), ce qui a conduit à la mise au point d'un estimateur de  $F_{st}$  basé sur l'analyse de variance (Weir & Cockerham, 1984).

La relation (1) établie par Wright n'est valable que pour le modèle en îles dans lequel chaque population peut recevoir avec la même probabilité des immigrants de n'importe quelle autre population de la métapopulation ; elle ne peut se concevoir que pour des études locales où tous les points de la surface échantillonnée ont la même probabilité d'être atteints par dispersion. Or le modèle d'isolement par la distance établi par Wright (1943) suppose que les fréquences alléliques sont plus semblables entre populations proches géographiquement qu'entre populations éloignées. En d'autres termes, ce modèle prédit que la différenciation génétique entre populations augmente avec la distance géographique les séparant. Des résultats théoriques démontrent qu'il existe une relation linéaire entre  $F_{st} / (1 - F_{st})$  et les distances géographiques pour des populations situées dans un habitat à une dimension, ou avec le logarithme de cette distance pour des populations occupant un habitat à deux dimensions (Rousset, 1997). La pente de la régression entre ces deux quantités dépend de

---

<sup>1</sup> **Taille efficace** : c'est le nombre d'individus d'une population idéale (de taille constante, les croisements entre individus se produisant simultanément et au hasard) pour lequel on aurait un degré de dérive génétique équivalent à celui de la population réelle. Elle caractérise le nombre d'individus participant au processus reproductif.



**Figure 1.5** : Parcelle de colza en fleurs.

la distance de dispersion et de la densité d'individus, ce qui donne un moyen d'estimer la distance de dispersion si la densité est connue. Cette méthode suppose un équilibre entre dérive génétique et migration et s'applique pour des espèces à distribution continue. De plus, les estimations obtenues sont cohérentes avec des mesures directes à une échelle locale, c'est-à-dire pour des distances  $d$  comprises entre  $\sigma$  et  $20\sigma$ , où  $\sigma^2$  est le carré de la demi-distance moyenne entre parents et progéniture (Rousset, 2000). Ces estimations sont robustes à de nombreux écarts sous-jacents aux modèles (Leblois *et al.*, 2003).

## 5. Le pathosystème *Leptosphaeria maculans* / colza

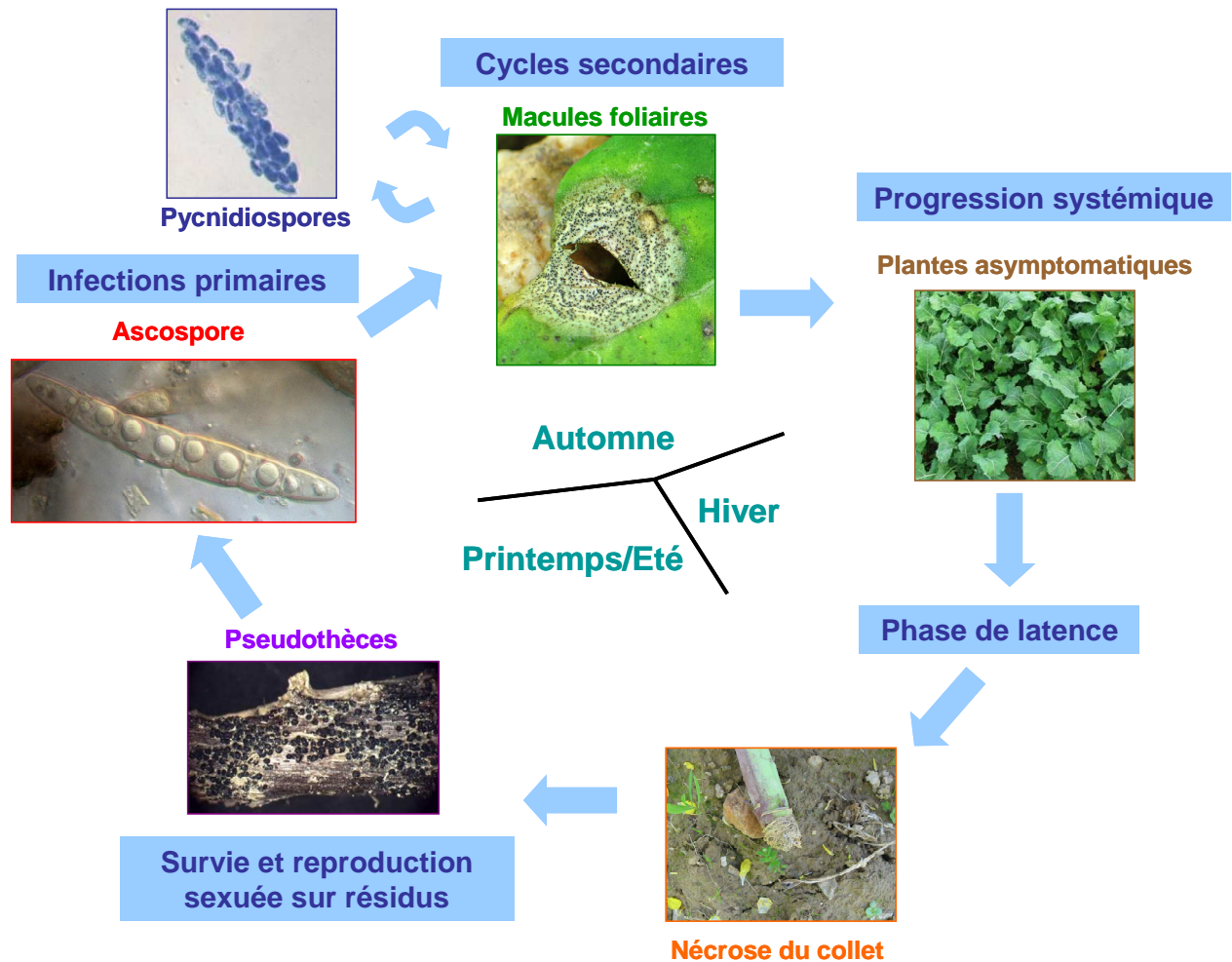
### 5.1 Le colza

Le colza (*Brassica napus* L.) est une espèce annuelle de la famille des Brassicacées (Figure 1.5). Cette espèce existe exclusivement sous forme cultivée, c'est d'ailleurs le principal oléoprotéagineux cultivé en France et en Europe largement devant le tournesol et le soja. En 2007, les surfaces françaises en colza étaient de 1,56 million d'hectares ([www.prolea.com](http://www.prolea.com)). Le colza est cultivé pour l'huile (alimentation humaine) et les protéines contenues dans les graines (tourteaux pour l'alimentation animale). L'huile de colza est également valorisée pour ses qualités de ressource renouvelable dans des usages autres qu'alimentaires. Sa principale application aujourd'hui dans ce domaine en France est le Diester®, biocarburant pour moteurs Diesel.

La production mondiale d'huile de colza a connu une forte progression ces dernières années : elle a été multipliée par trois depuis 1986 et sa part de marché est passée de 12 à 15 % de la production d'huile végétale entre 1986 et 2006. Elle se place désormais en troisième position derrière les huiles de soja et de palme avec 15 % de la production mondiale soit 18 millions de tonnes en 2006, dont environ un tiers produit en Europe (Prolea, 2007).

D'autres espèces cultivées font partie du genre *Brassica* : le chou (*B. oleracea*), la navette (*B. rapa*), les moutardes d'Abyssinie (*B. carinata*), brune (*B. juncea*) ou noire (*B. nigra*). Les génomes de ces espèces cultivées présentent de fortes similarités et dérivent d'un même génome ancestral. *B. napus* est une espèce amphidiploïde à  $2n = 38$  chromosomes, issue de l'hybridation interspécifique naturelle entre *B. oleracea* et *B. rapa*, elle cumule les 2 génomes de ces 2 dernières espèces.





**Figure 1.6** : Cycle de vie de *Leptosphaeria maculans*. Au début de l'automne, les ascospores libérées des pseudothèces formés sur les résidus de culture de colza causent les infections primaires de la maladie et donnent naissance aux macules foliaires et cotylédonaire. De manière nécrotrophe au niveau des macules, les organes de fructification asexués, les pycnides, se forment et exsudent des pycnidiospores dispersées à courte distance par la pluie. Ces pycnidiospores sont impliquées dans les cycles secondaires de la maladie et peuvent permettre l'apparition de foyers de macules sur une même plante et sur des plantes voisines. Des macules foliaires, le champignon progresse vers les pétioles et la tige de manière systémique et biotrophe dès l'automne et durant l'hiver. Durant ce stade de latence, les plantes ne présentent pas de symptômes visibles. Au printemps, lorsque le champignon atteint le collet des plantes, il provoque de manière nécrotrophe une nécrose liégeuse, de couleur beige à brunâtre, qui dans les cas les plus sévères cause la verse des plantes. Après la récolte du colza, au début de l'été, le champignon survit de manière saprophyte sur les résidus de culture et produit des fructifications sexuées, les pseudothèces, contenant les ascospores responsables des infections primaires de la maladie en début d'automne suivant.

## 5.2 Le *Phoma* du colza dû à *Leptosphaeria maculans*

### 5.2.1 Importance économique de la maladie

Le *Phoma* du colza (aussi appelé Nécrose du collet) est la maladie la plus préjudiciable aux cultures du colza, à la fois sur variétés d'hiver et de printemps. Cette maladie a une importance économique majeure en Europe, en Amérique du nord et en Australie (West *et al.*, 2001 ; Fitt *et al.*, 2006). En France, où le colza est principalement une culture d'hiver, la diminution de rendement due à la verse des plantes peut atteindre 20% (Pinochet *et al.*, 2003). Au Royaume-Uni, les pertes liées à la maladie ont été estimées à 56M€ par saison en 2000-2002 ([www.cropmonitor.co.uk](http://www.cropmonitor.co.uk)). Dans l'ouest Australien, pendant les saisons de culture 1998 et 1999, les pertes ont respectivement été estimées à 18.6M€ et à 49.4M€ (Khangura & Barbetti, 2001).

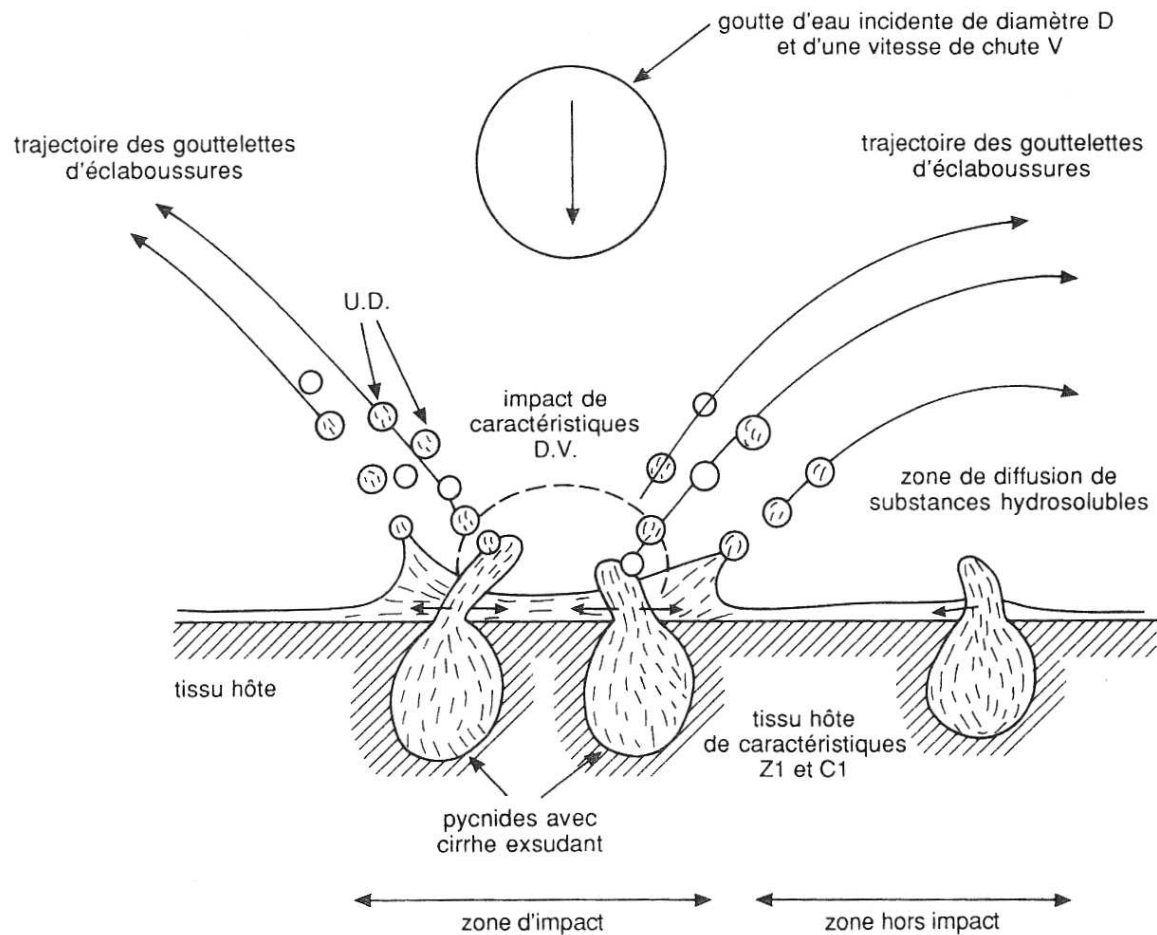
### 5.2.2 Taxonomie

Le *Phoma* du colza est actuellement considéré comme dû à un complexe d'espèces très similaires morphologiquement (Howlett, 2004). Auparavant, l'espèce « *L. maculans* » était divisée en deux groupes de souches, virulentes et avirulentes, agressives et non-agressives, Tox + et Tox 0, ou groupe A et groupe B (West *et al.*, 2001). Sur la base d'analyses de séquences d'ADN et de comparaisons morphologiques des fructifications produites *in vitro*, ces deux groupes sont aujourd'hui considérés comme deux espèces distinctes, le groupe A responsable principal de la nécrose du collet correspondant à *L. maculans* et le groupe B responsable d'autres dégâts correspondant à *L. biglobosa* (Shoemaker & Brun, 2001; Mendes-Pereira *et al.*, 2003). Nous considérerons seulement dans cette étude *L. maculans* qui est le principal responsable des dégâts les plus importants sur la culture du colza.

### 5.2.3 Cycle de vie (Figure 1.6)

#### *Survie et reproduction*

Entre les saisons de culture, *L. maculans* survit en saprophyte sous forme de mycélium sur les résidus et les semences infectés de la saison précédente. Ce mycélium peut produire des pseudothèces contenant des ascospores et des pycnides contenant des pycnidiospores dans des conditions favorables de température, lumière et humidité relative (Gabrielson, 1983; Williams, 1992). *L. maculans* est un champignon hétérothallique (Venn, 1979 ; Petrie & Lewis, 1985) ; la production de pseudothèces (fructifications sexuées) contenant les



**Figure 1.7 :** Représentation schématique du mécanisme de dispersion par éclaboussures ("rain-splash" ou "splashing") après impact d'une goutte d'eau de diamètre ( $D$ ) et de vitesse de chute ( $V$ ) sur une surface de caractéristiques données, d'après Rapilly (1991). Lors d'un épisode pluvieux, des gouttes de pluie entrent en collision avec les surfaces foliaires. Si la zone d'impact est porteuse de spores, ces dernières sont incorporées dans les gouttelettes d'éclaboussures et libérées hors de la zone d'impact. La dispersion des gouttelettes d'éclaboussures dépend de nombreux paramètres parmi lesquels la taille et la vitesse des gouttes incidentes et les caractéristiques de la cible. Le dépôt des spores contenues dans une gouttelette correspond à la rencontre d'un obstacle végétal par cette gouttelette.

ascospores sur les résidus de culture nécessite la rencontre de deux hyphes mycéliens de types sexuels compatibles au collet d'une même plante (Williams, 1992; Huang *et al.*, 2003). La période de persistance des résidus de culture dans les parcelles varie selon les conditions environnementales et les pratiques culturales et peut s'étendre à cinq années (Alabouvette & Brunin, 1970). Les ascospores sont considérées comme la principale source d'inoculum primaire, et la quantité de cet inoculum primaire est étroitement liée à la sévérité de l'épidémie sur la culture de colza lors de la précédente saison de culture (Lô-Pelzer *et al.*, 2008). D'autres espèces adventices de la famille des Brassicacées sont hôtes de *L. maculans*. Ces espèces sont *B. alba*, *B. arvensis*, *B. campestris*, *B. kaber*, *B. tournefortii*, *Raphanus raphanistrum*, *Sinapis arvensis*, *Thlaspi arvense* et *Sisymbrium* sp. (Gabrielson, 1983).

#### *Dissémination*

Les ascospores sont libérées lors d'épisodes pluvieux à une période débutant généralement lorsque de jeunes plants de colza sont présents dans les parcelles (West *et al.*, 2001) ou comme en Australie au moment de la période des semis de colza (Salisbury *et al.*, 1995). Cette période de libération se prolonge durant tout l'automne en France. Les ascospores sont supposées être transportées sur de longues distances (jusqu'à 8-10 kilomètres) par le vent (McGee, 1977). Des piégeages au champ d'ascospores sur des distances limitées montrent une rapide décroissance du nombre d'ascospores piégées dès les premières centaines de mètres (Salam *et al.*, 2001; Marcroft *et al.*, 2004).

Des observations au champ ont révélé la dissémination de la maladie par les spores issues de multiplication asexuée suite à des épisodes pluvieux (Barbetti, 1976), ou bien, plus récemment, suite au piégeage de pycnidiospores lors des épisodes pluvieux (Guo & Fernando, 2005). Les pycnidiospores qui constituent une source d'inoculum secondaire seraient ainsi disséminées vers les feuilles et les plantes voisines lors des pluies dans les gouttes d'éclaboussures par le mécanisme de "splashing" (Williams, 1992; Guo & Fernando, 2005) (Figure 1.7). Ces pycnidiospores peuvent avoir un rôle prédominant sur le développement des épidémies de Phoma dans des conditions d'humidité favorables (Li. *et al.*, 2004) bien qu'il soit considéré que les cycles secondaires dus aux pycnidiospores n'affectent pas le rendement (Hall, 1992).

#### *Germination, colonisation et symptômes*

Les ascospores et pycnidiospores germent sous des conditions d'humidité adéquates et produisent ainsi des hyphes mycéliens responsables de l'infection. L'infection des plantules résulte de l'invasion par le champignon des cotylédons et des jeunes feuilles via les stomates ou les blessures (Hammond *et al.*, 1985). Après germination, l'hyphe mycélien



**Figure 1.8** : Nécrose du collet.

**Tableau 1.2** : Les douze gènes spécifiques de résistance à *L. maculans* chez le colza : espèce source, variétés dans lesquelles le gène de résistance est introduit, nom du gène de résistance et localisation sur la carte génétique du colza. D'après Rimmer, 2006.

Source	Variété, lignée ou accession	Gène de résistance	Localisation
<i>Brassica napus</i>	Quinta', 'Scoop'	<i>Rlm1</i>	D-Y 10 <sup>a</sup> = N7 <sup>b</sup>
<i>B. napus</i>	Glacier', 'Bristol'	<i>Rlm2</i>	D-Y 16
<i>B. napus</i>	Columbus', Doublol'	<i>Rlm3</i>	D-Y 10 = N7
<i>B. napus</i>	Jet Neuf', 'Maluka'	<i>Rlm4</i> = <i>LEM1</i> <sup>c</sup>	D-Y 10 = N7
<i>B. napus</i>	accession française	<i>Rlm7</i>	D-Y 10 = N7
<i>B. napus</i>	Darmor-bzh'	<i>Rlm9</i>	D-Y 10 = N7
<i>B. juncea</i>	Aurea', 'Picra'	<i>Rlm5</i>	-
<i>B. juncea</i>	Aurea', 'Picra'	<i>Rlm6</i> = <i>Jlm1</i> <sup>d</sup>	D-Y 17
<i>B. rapa</i>	accession française	<i>Rlm8</i>	-
<i>B. rapa sylvestris</i>	lignée en sélection	<i>LepR1</i>	N2
<i>B. rapa sylvestris</i>	lignée en sélection	<i>LepR2</i>	N10
<i>B. rapa sylvestris</i>	Surpass 400'	<i>LepR3</i>	N10

<sup>a</sup> Delourme et al., 2004

<sup>b</sup> Parkin et al., 1995

<sup>c</sup> Ferreira et al., 1995

<sup>d</sup> Chèvre et al., 1997

colonise initialement les tissus en agent biotrophe via les espaces intercellulaires du mésophylle. Des lésions foliaires (ou macules) apparaissent quelques jours après cette colonisation. Ces macules sont des taches grises à vertes pâles qui peuvent mesurer jusqu'à 2 cm de diamètre. De manière nécrotrophe, au niveau des macules, le champignon forme les fructifications asexuées ou pycnides, contenant les pycnidiospores (West *et al.*, 2001).

Le champignon poursuit sa progression systémique dans la plante à l'intérieur des pétioles via les vaisseaux de xylème ou entre les cellules du parenchyme et du cortex (Hammond & Lewis, 1986). Cette phase systémique et biotrophe n'est pas associée à des symptômes visibles (Hammond *et al.*, 1985) jusqu'à ce que le champignon envahisse et détruise les cellules du cortex de la tige et provoque ainsi une nécrose noire et liégeuse à la base de la tige, au niveau du collet de la plante. Cette nécrose du collet (Figure 1.8) peut aller jusqu'à provoquer la verse des plantes, la plus dommageable au champ.

### **5.3 Méthodes de lutte contre le *Phoma* du colza**

#### **5.3.1 Lutte génétique**

La méthode la plus employée et la plus efficace pour lutter contre le *Phoma* du colza consiste à cultiver des variétés résistantes (Brun *et al.*, 1989 ; Aubertot *et al.*, 2006). On distingue communément deux types de résistance génétique à *L. maculans* chez *B. napus* : la résistance race-spécifique s'exprimant dès le stade plantule et la résistance quantitative ne s'exprimant qu'au stade plante adulte (Delourme *et al.*, 2004).

La résistance race-spécifique est contrôlée par des gènes majeurs de résistance à *L. maculans* (gènes *R*). Ce type de résistance est basé sur l'interaction « gène-pour-gène » entre les gènes *R* et les gènes d'avirulence correspondant (*Avr*) chez *L. maculans* (Ansan-Melayah *et al.*, 1998). Les résistances spécifiques du colza empêchent l'infection des jeunes plantules par les individus avirulents pour ce gène. Cependant, comme évoqué précédemment, deux gènes *R* ont été contournés trois ans après leur utilisation dans des variétés commerciales. Leur efficacité est donc limitée dans le temps en l'absence de stratégie de gestion durable de ces résistances ; aussi le nombre de gènes *R* est limité, ces gènes sont essentiellement dérivés par l'introgession de gènes d'autres espèces de *Brassica* et parfois même de la plante modèle apparentée *Arabidopsis thaliana* (Dixelius & Forsberg, 1999) (Tableau 1.2).

La résistance quantitative est sous le contrôle de plusieurs facteurs génétiques cartographiés par des "quantitative trait loci" (QTL) lors d'études sur la résistance de la variété de colza Darmor (Delourme *et al.*, 2004). Ce type de résistance, s'exprimant au stade adulte de la plante, n'empêche pas les infections cotylédonaire et foliaires. Au champ, les



plantes présentant ce type de résistance développent des nécroses du collet moins sévères que des plantes sensibles (Delourme *et al.*, 2006).

### 5.3.2 Lutte culturale

La lutte génétique contre le Phoma du colza peut se révéler d'autant plus efficace qu'elle est combinée avec des pratiques culturales adaptées. Ces pratiques visent principalement à réduire la production d'inoculum primaire entre les saisons de culture et à limiter le développement épidémique durant la saison de culture.

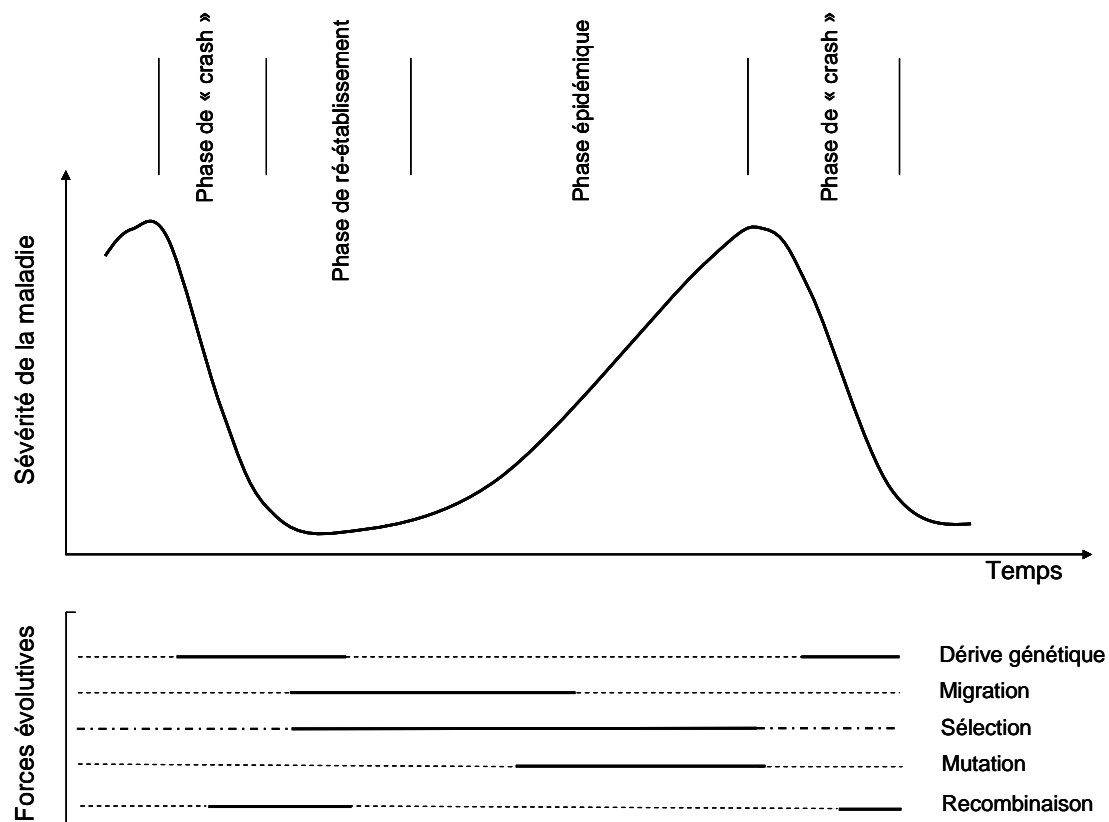
En observant la survie du champignon sur les débris de culture, Alabouvette et Brunin (1970) préconisaient déjà l'enfouissement des résidus de culture pour bloquer le cycle de l'agent pathogène. Depuis, Turkington *et al.* (2000) et Schneider *et al.* (2003) ont montré que l'enfouissement des résidus accélérerait leur décomposition et que le travail du sol (broyage, enfouissement par labour) diminuait la quantité de résidus présents à la surface du sol, et ainsi la quantité d'inoculum primaire disponible en début de saison culturale suivante. Il est recommandé aux agriculteurs de respecter un délai de quatre ans entre deux cultures de colza sur une même parcelle afin de diminuer le risque de contamination par des ascospores libérées par d'anciens résidus infectés (West *et al.*, 2001). En Australie, un espacement de 500 mètres entre les nouvelles parcelles de colza et les résidus sources d'ascospores de la saison précédente est préconisé aux agriculteurs (Marcroft *et al.*, 2004).

Les effets des dates de semis et des disponibilités en azote du sol ont été étudiés par Aubertot *et al.* (2003) dans des parcelles expérimentales du Bassin Parisien. Un semis précoce réduit la sévérité des nécroses du collet, alors qu'une forte disponibilité en azote durant les stades végétatifs les favorise. Les systèmes de culture influencent donc le cycle épidémique de *L. maculans* (Aubertot *et al.*, 2006).

### 5.3.3 Lutte chimique et biologique

Des traitements fongicides foliaires ou sur résidus de culture sont envisageables et peuvent être rentables dans les régions où le rendement est élevé, mais ils sont contestables du fait de leur impact sur l'environnement. Les applications foliaires permettent de diminuer la sévérité des nécroses au collet, mais le positionnement de ces traitements est essentiel et difficile car ils deviennent inefficaces lorsque *L. maculans* a déjà engagé sa croissance systémique dans les tissus de la plante (West *et al.*, 1999). Les traitements fongicides sur résidus de culture peuvent permettre de retarder la maturation et la libération des spores produites sur ces résidus et peuvent ainsi permettre de désynchroniser cette période de





**Figure 1.9** : Etapes du cycle épidémique de *L. maculans* et forces évolutives agissant sur les populations du champignon. Entre les saisons de culture, les populations de *L. maculans* subissent une forte diminution de leurs effectifs, c'est la phase de « crash » durant laquelle la dérive génétique et la recombinaison par reproduction sexuée sont les principales forces évolutives structurant les populations. La phase de « crash » peut conduire à l'extinction de certaines populations. Puis la migration des ascospores intervient dans la phase de ré-établissement de la maladie et permet la colonisation de nouvelles parcelles de colza. La sélection imposée par les variétés de colza agit à ce stade et lors de la phase épidémique de croissance exponentielle de la maladie, où la mutation devient également importante dans ces populations de grande taille. Durant les phases de ré-établissement et épidémique, la croissance des effectifs peut varier considérablement entre les populations. En fin de saison de culture, la population connaît à nouveau une phase de « crash ». La dynamique démographique et génétique de la métapopulation correspond à la somme des dynamiques de chaque population. D'après Burdon, 1993.

libération des spores et la période de forte sensibilité du colza au stade plantule (Wherrett *et al.*, 2003).

Des agents de lutte biologique contre *L. maculans* présentent des potentialités de contrôle de la maladie (pour revue voir Aubertot *et al.*, 2006). Par exemple, la bactérie *Erwinia herbicola* possède des propriétés antagonistes à *L. maculans* par la sécrétion de substances antifongiques et de la même manière la bactérie *Paenibacillus polymyxa* réduit la germination des conidies de *L. maculans*. Ces effets ont été mis en évidence au laboratoire, leur potentiel d'application en conditions de plein champ reste à démontrer.

#### **5.4 Cycle épidémique et stratégies de gestion des résistances du colza**

Les forces évolutives influençant la structure génétique de la population pathogène diffèrent par leur importance à chacune des étapes du cycle épidémique (Figure 1.9). Le recours à des pratiques culturales adaptées à chacune de ses étapes au regard des forces évolutives impliquées peut permettre de gérer durablement les résistances du colza.

Entre les saisons de culture du colza, la population pathogène subit une réduction importante de son effectif pouvant aller jusqu'à l'extinction des populations si les résidus sont correctement enfouis. La dérive génétique est la principale force évolutive en jeu et conduit à la perte d'allèles dans la population et à une diminution de la diversité génétique et donc du potentiel adaptatif du champignon. Durant cette phase de « crash », plusieurs actions sont envisageables pour accentuer les effets de la dérive génétique. La production et l'émission de l'inoculum pendant l'intersaison peut être réduite par la destruction des résidus par l'enfouissement en Europe (Schneider *et al.*, 2003), par brûlis en Australie, par collecte en Chine, par l'action de pesticides ou encore par lutte biologique (Turkington *et al.*, 2000; West *et al.*, 2001; Aubertot *et al.*, 2006).

Après la phase de diminution des effectifs de l'agent pathogène durant l'intersaison s'ensuit la phase de ré-établissement de la maladie sur son hôte. A cette étape la migration de l'agent pathogène est fondamentale pour la rencontre de son hôte. A ce stade il est possible de limiter voire d'empêcher cette migration en maintenant des distances entre parcelles de colza supérieures aux capacités de dispersion de *L. maculans*. Le choix des dates et densités de semis est également important pour d'une part désynchroniser la présence des plantules sensibles de colza et la période d'émission des ascospores, et d'autre part limiter la surface végétale d'interception des ascospores.



A cette étape de ré-établissement de la maladie et lorsque des spores de *L. maculans* atteignent les nouveaux champs de colza, la pression de sélection exercée par les variétés résistantes est la principale force évolutive influençant la structure de la population pathogène ; la diversification spatiale et temporelle des gènes de résistances entre parcelles permet de ne pas conférer d'avantage sélectif aux individus porteurs d'une virulence inutile à l'infection des parcelles voisines, et donc limite l'augmentation en fréquence des individus virulents. Les mélanges de variétés résistantes se basent sur le même principe mais à l'échelle d'une parcelle : la diversification des pressions de sélection ne favorise pas un type de virulence en particulier. Le pyramidage de gènes majeurs de résistance exerce quant à lui une pression de sélection extrêmement forte qui limitera également le nombre d'infections primaires de la maladie.

Après l'établissement de la maladie sur une parcelle, la population pathogène connaît une phase d'accroissement de ses effectifs, c'est la phase épidémique. Durant cette phase d'augmentation de la taille de la population, les mutations peuvent être importantes et générer de nouvelles virulences (par perte du gène d'avirulence). Il est possible de réduire la croissance épidémique de la population de *L. maculans* sur une parcelle par l'application de fongicides dès les infections foliaires (les fongicides sont inefficaces après la pénétration systémique du champignon). Ces applications de fongicides peuvent permettre de limiter la sporulation sur les macules issues des infections primaires et ainsi limiter l'expansion de la maladie par cycles secondaires.

L'épidémie s'achève par la colonisation du collet des plantes de colza et le maintien du champignon sur les débris de tige de colza dans les parcelles. A ce stade, outre les effets de la dérive génétique évoqués précédemment, la recombinaison par reproduction sexuée permet les associations d'allèles de virulence et/ou d'agressivité. Pour limiter l'accès au site de la reproduction sexuée (les tiges de colza), l'emploi de résistances partielles semblerait une méthode efficace de réduction des effectifs colonisant les tiges. Comme pour accentuer les effets de la dérive génétique, les mêmes pratiques culturales (enfouissement des résidus, traitements fongicides sur résidus) peuvent limiter les capacités de reproduction sexuée de *L. maculans*.



## **6. La reproduction sexuée : facteur adaptatif chez *L. maculans***

### **6.1 Reproduction sexuée et capacités de dispersion de *L. maculans***

Les capacités de dispersion des agents pathogènes sont primordiales pour permettre à un individu apparu par mutation dans une sous-population (acquisition d'une virulence) de se propager vers d'autres sous-populations de la métapopulation. Ce processus est d'autant plus important que la sous-population où est apparu ce caractère avantageux peut connaître une phase d'extinction : les parcelles de colza ne sont pas implantées sur les mêmes sites d'une saison de culture à une autre.

A l'instar de celles d'autres champignons phytopathogènes, tels *Mycosphaerella fijiensis*, *M. graminicola* ou *Stagonospora nodorum* (McDonald *et al.*, 1994; Carlier *et al.*, 1996; Kema *et al.*, 1996), les ascospores issues de reproduction sexuée de *L. maculans* possèdent des capacités de dispersion élevées. Ces ascospores sont dispersées par le vent ; bien qu'il soit considéré que la majorité des ascospores sont déposées à quelques centaines de mètres des résidus d'où elles proviennent, la littérature estime des distances supérieures de dispersion des ascospores de l'ordre de la dizaine de kilomètres (McGee, 1977).

La reproduction sexuée produit donc des ascospores dispersées à longue distance et permet ainsi à *L. maculans* de coloniser des hôtes distants et donc de diffuser dans la population régionale des caractères sélectivement avantageux tels une virulence. Cette capacité de dispersion à longue distance est d'ailleurs un des critères retenus par McDonald & Linde (2002) pour établir leur système de classification des agents pathogènes en fonction de leur potentiel adaptatif face aux résistances variétales.

### **6.2 Reproduction sexuée et recombinaison méiotique**

*L. maculans* est un champignon à hétérothallisme bipolaire : la reproduction sexuée se produit uniquement lorsque deux hyphes mycéliens compatibles se rencontrent. Déterminée génétiquement, cette compatibilité sexuelle est sous contrôle monogénique : le locus correspondant, dénommé MAT, possède deux idiomorphes différents (les deux formes alternatives du gène MAT codent pour des protéines différentes), dénommés MAT1-1 et MAT1-2, du fait des similarités de séquences avec les gènes de fonction similaire décrits chez les autres ascomycètes. Ainsi, des croisements fertiles (aboutissant à la formation de pseudothèces contenant les ascospores) ne sont possibles qu'entre deux souches possédant des idiomorphes différents au locus MAT (Cozijnsen & Howlett, 2003).



Les populations de *L. maculans* peuvent produire des pycnidiospores au cours d'une saison culturale, mais il existe à chaque saison (entre deux cultures de colza durant l'été en France) une phase de reproduction sexuée se produisant sur les résidus de tige de colza laissés dans les champs après la récolte. La reproduction sexuée favorise et maintient la diversité génétique dans les populations en modifiant les associations de gènes et d'allèles par recombinaison. Plusieurs études ont révélé l'importance potentielle de la reproduction sexuée de *L. maculans* par la caractérisation génotypique de populations à l'aide de marqueurs moléculaires divers (Mahuku *et al.*, 1997; Purwantara *et al.*, 2000; Barrins *et al.*, 2004; Gout *et al.*, 2006; Hayden *et al.*, 2007). Ces études canadiennes, australiennes et françaises ont toutes révélé de forts niveaux de diversité génétique et génotypique au sein des populations de *L. maculans*, ainsi que des gamètes à l'équilibre de liaison, deux indices concordants suggérant la part prépondérante de la reproduction sexuée dans le cycle de vie du champignon (Milgroom, 1996). Aussi les nombreuses observations macroscopiques de pseudothèces (organes de reproduction sexuée) sur résidus de culture soutiennent cette hypothèse (Hall, 1992 ; West *et al.*, 2001). Ce mécanisme semble donc efficace dans les populations de *L. maculans* et permettrait l'association d'allèles de virulence dans un même génotype.

### **6.3 Changements géniques et chromosomiques associés à la méiose**

Les changements géniques et chromosomiques sont généralement associés aux événements de mitose ou de méiose (Burnett, 2003). Les éléments transposables qui affectent la structure des gènes et les réarrangements chromosomiques sont répandus chez les champignons (Daboussi & Capy, 2003), particulièrement chez *L. maculans* dont les caractéristiques génomiques décrites ci-dessous traduisent la flexibilité génétique lors des événements de méiose et donc de reproduction sexuée.

Le génome de *L. maculans* a récemment été séquencé. Sa taille, estimée à 44,9 Mb, est sensiblement plus grande que celles des génomes séquencés d'espèces apparentées comme *S. nodorum* (37 Mb) et *M. graminicola* (39,6 Mb). Cette taille supérieure semble principalement due à l'abondance d'éléments transposables dans le génome de *L. maculans* (Kuhn *et al.*, 2006). Ces éléments transposables représenteraient environ 30 % du génome de *L. maculans*, alors qu'ils ne représentent que 4,25 % du génome de *S. nodorum* et moins de 1,6 % du génome de *M. graminicola*. Chez *L. maculans* les éléments transposables sont organisés en isochores : de longs segments d'ADN relativement homogènes dans leur composition nucléotidique (% G-C) et organisés en mosaïque avec des alternances abruptes d'un type d'isochore à un autre.





La cartographie des gènes d'avirulence de *L. maculans* a révélé que sept des neuf gènes connus étaient organisés en deux clusters : *AvrLm1-AvrLm2-AvrLm6* et *AvrLm4-AvrLm7-AvrLm9*, *AvrLm5* et *AvrLm8* n'étant génétiquement liés ni entre eux, ni avec les deux clusters (Balesdent *et al.*, 2002). Trois gènes d'avirulence ont été clonés (*AvrLm1*, *AvrLm6* et *AvrLm4-7*) (Gout *et al.*, 2006; Parlange, 2006; Fudal *et al.*, 2007), appartenant à des isochores riches en éléments transposables. Ces isochores sont pour l'essentiel riches en nucléotides A+T (60-70 %), exclusivement composés de séquences répétées et occupés par des rétrotransposons tronqués dégénérés correspondant à de l'hétérochromatine. Cet environnement des gènes d'avirulence semble propre à *L. maculans*. Les isochores organisés en mosaïques sont dégénérés par le processus mutationnel de RIP (Repeat Induced Point mutation) (Attard *et al.*, 2005), un mécanisme de mutation pré-méiotique limitant par inactivation l'invasion des séquences répétées et se traduisant par des transitions de C vers T et de G vers A.

Chez *L. maculans* dans les régions chromosomiques riches en A-T se produisent des réarrangements chromosomiques régulés par les éléments transposables. Les éléments transposables ont un effet mutagène qui peut s'exercer directement par insertion dans un gène ou excision aberrante conduisant à des délétions, additions ou translocations de séquences (Ganko *et al.*, 2003). Les modifications peuvent aussi être indirectes via des réarrangements chromosomiques provoqués par une recombinaison ectopique impliquant plusieurs copies dispersées dans le génome et provoquant une instabilité caryotypique qui se traduit par des inversions et translocations dans l'ordre des gènes (Daboussy & Capy, 2003). Les séquences répétées peuvent parfois constituer une menace pour la stabilité des génomes d'où la mise en place du processus d'inactivation par RIP mais elles contribuent à augmenter la capacité évolutive par création de nouveaux gènes ou modification de leur régulation (Ganko *et al.*, 2003).

La localisation des trois gènes d'avirulence clonés dans des régions chromosomiques instables et riches en éléments répétés constituerait un mécanisme évolutif assurant des réponses rapides par réarrangements chromosomiques face aux pressions de sélection exercées par les résistances de l'hôte. Ainsi l'évolution du gène *AvrLm1* vers la virulence s'est principalement effectuée par délétion d'une grande région chromosomique ou parfois par l'introduction d'un codon stop suite à des mutations de type RIP (Gout *et al.*, 2007). Dans le cas du gène d'avirulence *AvrLm4-7*, l'inactivation par RIP ou l'insertion d'un rétrotransposon est également postulée pour expliquer son évolution vers la virulence (Parlange, 2006).



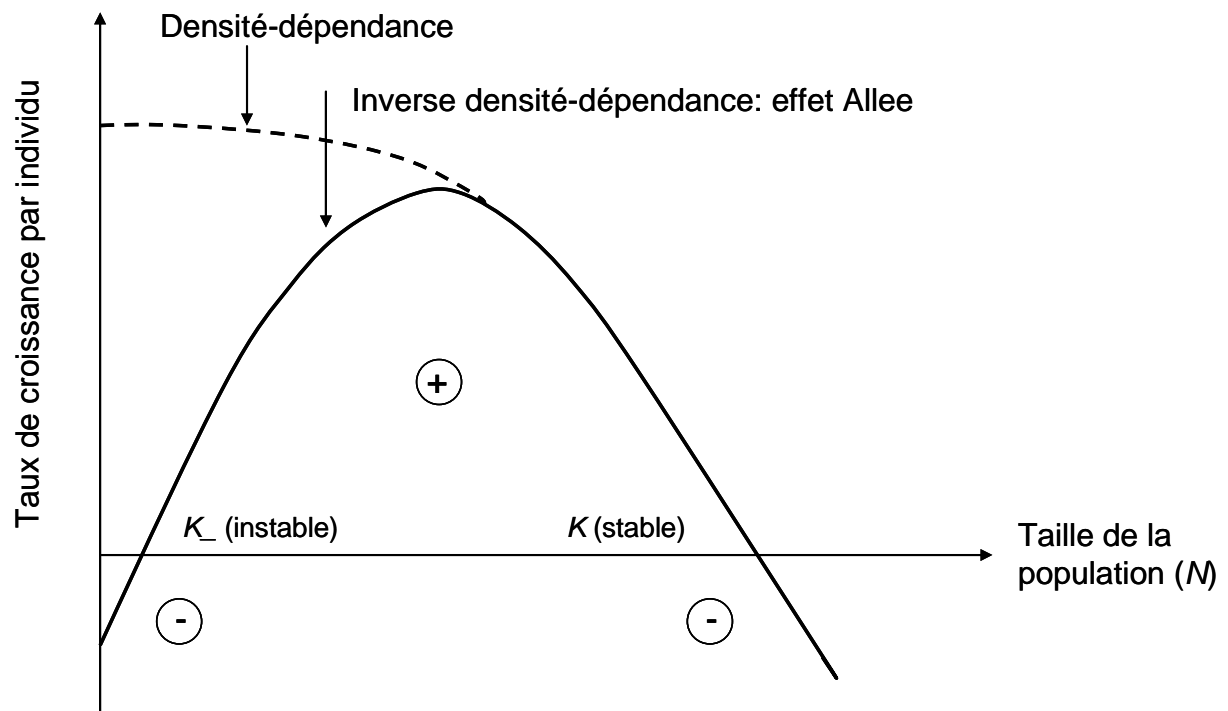
L'existence des clusters *AvrLm1-2-6* (Gout *et al.*, 2006b) et *AvrLm3-4-7-9* pourrait avoir été sélectionnée comme un facteur favorable au renforcement de la capacité évolutive des gènes d'avirulence et donc aux capacités d'adaptation de *L. maculans* (Parlange, 2006).

## **7. La reproduction sexuée chez *L. maculans* : causes potentielles d'échec**

*L. maculans*, champignon hétérothallique, fait partie des espèces fongiques chez lesquelles la reproduction sexuée implique le croisement de deux souches de types sexuels compatibles. Dans ce cas ce sont les pycnidiospores asexuées et le mycélium se développant à partir de ces spores qui constituent les partenaires de la reproduction sexuée. Comme nous l'avons vu précédemment, la phase asexuée est prédominante dans le cycle de vie de *L. maculans* et la phase sexuée est réduite à une étape unique lors d'un cycle saisonnier. *L. maculans* est ainsi un Ascomycète caractéristique, avec un cycle de vie haplo-diploïde, où la phase haploïde prédomine à la fois dans le temps et dans l'espace et la diploïdie n'apparaît que dans la cellule zygotique et est immédiatement suivie par la méiose (Burnett, 2003).

Même si une espèce fongique possède la capacité de se reproduire sexuellement, ce phénomène peut se révéler rare dans la nature, et ceci pour de multiples raisons. Les conditions environnementales ou nutritionnelles peuvent se révéler adverses, des souches stériles peuvent être prédominantes, ou les souches inter-fertiles peuvent être distribuées de manière différentielle dans l'espace, si bien que l'absence d'un partenaire compatible empêche la reproduction sexuée (Burnett, 2003). Par exemple, Notteghem & Silué (1992) ont montré que les types sexuels de *Magnaporthe grisea* n'étaient distribués similairement ni géographiquement, ni numériquement : 32 % étaient du type sexuel *Mat-1*, 20 % du type sexuel *Mat-2*, et les 48 % restant étaient incapables de croisements fertiles avec des souches tests. Chez ce même agent pathogène, la présence des deux types sexuels n'est pas suffisante pour garantir le succès de la reproduction sexuée. Par exemple, les croisements entre souches des deux types sexuels collectées soit en Côte d'Ivoire soit au Cameroun étaient tous stériles. Les souches de *M. grisea* provenant d'hôtes différents diffèrent aussi par leur fertilité : les souches collectées sur blé ou millet se sont révélées très fertiles, contrairement à celles récoltées sur riz.

Chez les espèces à reproduction sexuée la difficulté de trouver un partenaire pour la reproduction sexuée est une des causes possibles et largement décrite de l'effet Allee (Allee, 1931). Allee a observé que de nombreuses espèces animales et végétales souffraient d'une



**Figure 1.10** : Illustration schématique de l'effet Allee. Le taux d'accroissement par individu est négatif au dessus de la capacité du milieu ( $K$ ) et positif en dessous. En présence d'un effet Allee, le taux d'accroissement par individu diminue sous une taille de population donnée, et peut même devenir négatif sous un seuil critique ( $K_-$ ). Lorsqu'une population suivant ce type de dynamique est amenée sous le seuil critique, le taux d'accroissement par individu faible ou négatif peut conduire cette population à l'extinction. D'après Courchamp *et al.*, 1999.

diminution de leur taux d'accroissement par individu lorsque leurs populations atteignaient de faibles effectifs ou densités (Figure 1.10). Ce phénomène se caractérise par une diminution de succès reproducteur dans les populations à faibles densités d'individus, soulignant les bénéfices apportés par la présence de conspécifiques pour un individu.

L'effet Allee se définit comme la relation positive entre une mesure de la fitness d'un individu et la taille de la population à laquelle appartient cet individu, taille exprimée en nombre ou en densité de conspécifiques. Lorsque cette relation s'applique au niveau global de la fitness d'une population, on parle alors d'effet Allee démographique (Odum & Allee, 1954). L'effet Allee est une régulation densité-dépendante positive de la croissance de la population lorsque la densité est faible. Les principaux facteurs provoquant ce mode de régulation sont de trois types. Le premier type correspond à une perte de diversité génétique et à de la consanguinité conduisant à une diminution de la fitness (chez les plantes voir Fischer & Matthies, 1998). Le second type correspond à de la stochasticité démographique incluant les fluctuations du sex-ratio (chez les oiseaux voir Clout & Merton, 1998). Enfin, la troisième catégorie concerne la réduction des interactions coopératives quand les individus sont trop peu nombreux, ce qui par exemple correspond à la nécessité d'une taille de groupe minimale pour élever ses descendants et chercher de la nourriture chez les animaux grégaires, ou encore pour résister à la prédation (Courchamp *et al.*, 1999; Boukal & Berec, 2002). Dans cette dernière catégorie de facteurs menant à un effet Allee, la difficulté de rencontre entre partenaires de la reproduction sexuée lorsque la densité de population est faible a été le phénomène le plus largement étudié chez les plantes et les animaux (pour revue voir Courchamp *et al.*, 1999).

L'effet Allee a récemment été pris en compte dans un modèle de simulation du développement épidémique du champignon hétérothallique *Tilletia indica* pathogène du blé responsable de la carie de Karnal (Garrett & Bowden, 2002). Ce modèle prédit que l'effet Allee peut intervenir dans le cycle de vie de ce champignon et ainsi limiter son potentiel invasif, notamment au front de l'aire de colonisation des spores du champignon dispersées par le vent. Ces auteurs prédisent également un seuil de taille de population (variable en fonction des conditions environnementales) en deçà duquel le taux de croissance de la population est censé diminuer. Cette étude met aussi l'accent sur les pratiques culturales (traitements fongicides, résistance partielle) permettant d'amener la taille de la population pathogène vers ce seuil.

L'effet Allee a en effet des implications fortes sur l'écologie et l'évolution des populations et a été largement étudié en biologie de la conservation et en écologie comportementale (pour



revue voir Stephens & Sutherland, 1999). Il influence également la dynamique des populations qui subissent ce phénomène, la principale implication étant une densité critique sous laquelle la population tend vers l'extinction, phénomène pouvant limiter les taux d'expansion des espèces introduites ou des organismes invasifs par exemple (Lewis & Kareiva, 1993).

## 8. Problématique et objectifs de ce travail de thèse

Cette synthèse bibliographique illustre les capacités d'adaptation des agents pathogènes face aux pressions de sélection exercées par les gènes de résistance spécifique des variétés de plantes hôtes. *L. maculans* présente un potentiel adaptatif élevé du fait de sa biologie particulière alliant reproduction sexuée et migration à longue distance. Nous pouvons également penser que ce champignon présente de grandes tailles efficaces de populations grâce à ses capacités saprophytiques sur résidus de culture, ce qui réduit l'effet de la dérive génétique et amplifie celui de la mutation. Des stratégies de gestion durable des résistances spécifiques du colza (limitées en quantité) peuvent être proposées en s'appuyant sur la compréhension des forces évolutives agissant lors du cycle épidémique. Une des étapes critiques de ce cycle épidémique permettant l'adaptation des populations de *L. maculans* est constituée par la reproduction sexuée, qui produit des spores dispersées à longue distance, qui réarrange les associations d'allèles et génère de nouveaux génotypes, et qui donne lieu à des réarrangements chromosomiques et géniques sous l'effet des éléments transposables et des mutations de type RIP. Pour améliorer la durabilité des résistances spécifiques du colza et éviter les phénomènes de contournement tels que ceux déjà observés, il faudrait empêcher la reproduction sexuée de *L. maculans*. Cette recommandation peut sembler utopique car *a priori* inatteignable, mais la dynamique particulière de la phase initiale du contournement des résistances variétales spécifiques ouvre des perspectives prometteuses :

- lorsqu'un gène majeur de résistance vient d'être déployé dans des variétés commerciales, la fréquence de la virulence correspondante est faible dans la population pathogène, la densité de la population pathogène virulente sur ces variétés est donc faible ;
- dans ces populations de faible densité le succès de la reproduction sexuée et donc le taux d'accroissement de la population peut être très limité voire devenir négatif, surtout si des pratiques culturales visant à minimiser les effectifs virulents sont mises en place.





La reproduction asexuée du champignon qui produit de grands nombres de conidies lors du cycle épidémique pourrait constituer un mécanisme de compensation du potentiel effet Allee connu par ces populations virulentes fondatrices en favorisant la rencontre de souches de types sexuels compatibles sur une même plante. Néanmoins, le cycle de *L. maculans* présente une phase de colonisation systémique des tissus du colza qui lui permet d'atteindre la tige de colza à partir d'infections cotylédonaire et foliaires. La tige est le site de la reproduction sexuée, si bien que l'accès à ce site est très lié à la réussite concomitante de la colonisation systémique de la tige par des souches sexuellement compatibles. Cette étape pourrait donc limiter le succès de la reproduction sexuée.

Lorsque la reproduction sexuée est effective dans les nouvelles populations virulentes, des ascospores virulentes sont produites entre deux saisons de culture du colza. Ces ascospores sont potentiellement capables de coloniser des parcelles de colza distantes de plusieurs kilomètres (bien que la détermination de cette échelle de dispersion soit très approximative) et ainsi de transmettre ce caractère adaptatif au sein de la métapopulation pathogène. En l'absence de connaissances précises sur ces capacités de dispersion, il devient difficile d'établir des stratégies de gestion spatiale des résistances variétales permettant de ne pas conférer d'avantage sélectif aux souches acquérant une virulence dans une région et se dispersant vers d'autres zones géographiques ou une autre source de résistance est employée.

Les objectifs de ce travail de thèse sont d'examiner les mécanismes épidémiologiques impliqués dans la rencontre des partenaires de la reproduction sexuée au collet de la tige d'une même plante, puis de déterminer l'échelle spatiale à laquelle les migrations des spores issues de reproduction sexuée sont significatives. Pour atteindre ces objectifs, ce travail a été organisé en trois parties présentées dans les trois chapitres suivants.

- Le premier objectif est d'étudier le mécanisme de dispersion des spores issues de multiplication asexuée de *L. maculans* et de vérifier l'existence d'un mécanisme jusqu'alors supposé dans la littérature à partir d'indices indirects. Nous nous sommes proposés de quantifier ce mécanisme et d'établir à la fois des gradients de dispersion des pycnidiospores et de la maladie en conditions contrôlées, puis de vérifier l'importance de ce mécanisme en conditions de plein champ.
- Le deuxième objectif est de vérifier dans quelle mesure l'étape de colonisation systémique du colza peut constituer un mécanisme limitant la rencontre de souches



de types sexuels compatibles dans la tige d'une même plante. Nous examinerons précisément les effets du nombre de sites infectieux, de la compétition entre souches et de la résistance polygénique de l'hôte sur la réussite de la colonisation systémique de la tige de colza.

- Le troisième objectif est de déterminer, de manière indirecte, les capacités de dispersion des ascospores de *L. maculans*. Cette partie alliera des méthodes d'épidémiologie et de génétique des populations et devrait permettre, outre l'inférence des distances de dispersion des ascospores, de caractériser la diversité génétique des populations françaises de *L. maculans*.



## DISPERSION PAR LA PLUIE DES PYCNIDIOSPORES DE *LEPTOSPHAERIA* *MACULANS*

### PARTIE I : Etude en conditions contrôlées

*Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans le journal « Plant Pathology » (Article 1) :*

Travadon R, Bousset L, Saint-Jean S, Brun H, Sache I, 2007. Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* **56**, 595-603.

*Une synthèse bibliographique sur l'émission des pycnidiospores a également été rédigée sur la base des travaux menés dans ce chapitre. Elle sera publiée en 2008 par le CETIOM dans un ouvrage intitulé « Le point sur le Phoma » (Annexe 1).*

### 1. Problématique

Nous étudierons dans ce chapitre la dispersion par la pluie des spores issues de multiplication asexuée du champignon, les pycnidiospores. Le rôle épidémiologique des pycnidiospores a jusqu'ici été largement négligé, et leur dispersion a rarement été envisagée comme moyen de transport pour le champignon.

La sous-estimation du rôle épidémiologique des pycnidiospores par rapport à celui des ascospores est notamment due à des différences dans leur processus infectieux : (1) la germination, la pénétration des hyphes germinatifs et le développement des macules foliaires sont plus précoces (jusqu'à 2 jours plus tôt) à partir d'infections par des ascospores (Li. *et al.*, 2004); (2) la quantité de pycnidiospores nécessaire à l'infection est beaucoup plus grande que celle d'ascospores (Wood & Barbetti, 1977) ; et, (3) les ascospores sont émises en grande quantité dès les premiers stades de la culture du colza et pendant parfois plusieurs mois.

Cependant, des observations au champ ont révélé la dissémination des conidies issues de la reproduction asexuée de la maladie lors d'épisodes pluvieux (Barbetti, 1976 ; Hall *et al.*, 1996), ou bien, plus récemment, suite au piégeage de pycnidiospores lors des épisodes pluvieux (Guo & Fernando, 2005). Bien qu'ancrée dans les esprits l'existence de la dispersion par la pluie des pycnidiospores est longtemps restée basée sur des indices indirects.



**Figure 2.1** : Générateur de gouttes. A: système de potence fixe avec lames collectrices au sol. B: Détail de la seringue.

En quantifiant les distances de dispersion des pycnidiospores et de la maladie, nous appréhenderons dans quelle mesure ce mécanisme passif de transport du champignon peut influencer la rencontre d'individus virulents de types sexuels compatibles et ainsi faciliter la reproduction sexuée.

L'étude du pouvoir infectieux de pycnidiospores dispersées à partir de résidus de culture nous informera également sur la capacité des pycnidiospores à constituer un moyen direct de transmission d'individus entre saisons culturales. Nous discuterons des implications de ce mécanisme de dispersion dans le contexte précis de populations fongiques virulentes de faible densité et de ses conséquences sur la transmission de descendants.

Dans ce chapitre, des travaux conduits en conditions de laboratoire vont nous permettre d'aborder les trois questions suivantes :

- Les pycnidiospores sont-elles effectivement dispersées par la pluie ?
- Quel est le gradient de dispersion des pycnidiospores libérées à partir de macules foliaires sous l'action de gouttes de pluie incidentes?
- Quel est le gradient de dispersion de la maladie consécutif à un épisode pluvieux affectant des résidus de colza porteurs de pycnides ?

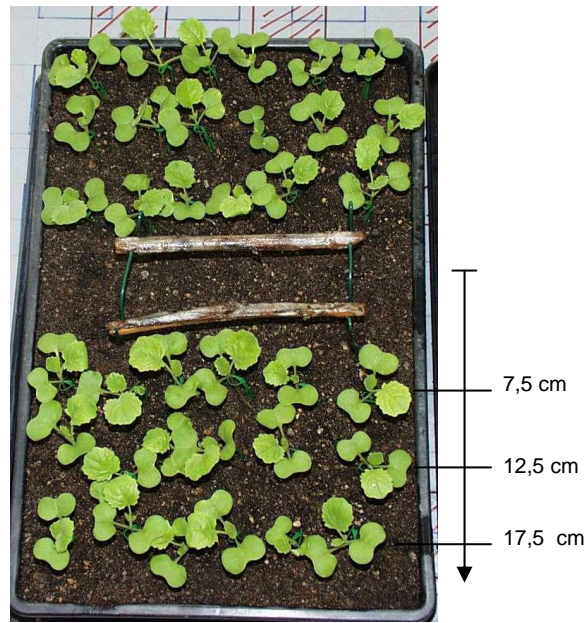
## **2. Matériel et Méthodes** (pour une description détaillée se référer à l'article 1)

### **2.1 Générateur de gouttes incidentes**

Le dispositif nous permettant de générer des gouttes incidentes est constitué d'une seringue de 20 mL placée à 1 m du sol à l'aide d'un système de potence fixe (Figure 2.1). Sur la seringue est adaptée une aiguille de diamètre 0,5 ou 1,1 mm, libérant des gouttes de diamètre moyen 2,1 et 2,8 mm, respectivement. La solution introduite dans la seringue est additionnée de bleu coton, colorant facilitant la visualisation des gouttelettes d'éclaboussures et des spores transportées dans ces gouttelettes.

Pour l'ensemble des expérimentations conduites avec le générateur de gouttes incidentes, les sources de pycnidiospores étaient constituées soit de macules foliaires (classées en catégories en fonction du nombre de pycnides portés par macule), soit de résidus de tiges de colza porteurs de pycnides, ces deux sources ayant été récoltées au champ.





**Figure 2.2 :** Plantes pièges et résidus sporulants placés sous simulateur de pluie.

Les sources de spores ont été maintenues horizontalement sous le générateur de gouttes incidentes et les gouttelettes d'éclaboussures ont été recueillies sur des lames de verre situées de part et d'autre de ces sources. Les gouttelettes d'éclaboussures recueillies sur les lames ont été observées au microscope (\*400) pour détecter et dénombrer les pycnidiospores.

## **2.2 Simulateur de pluie**

Le système de jet commandé par microprocesseur de Deltalab, EID 330, construit par l'Orstom (Asseline et Valentin, 1978), a été employé pour simuler des épisodes pluvieux en air calme. Des précipitations ont été simulées par une buse oscillant à vitesse constante avec un angle de 180° placée à une hauteur de 3,8 m. La pression de l'eau au niveau de la buse était de 62 kPa. Toutes les expérimentations ont été menées dans le mètre carré au centre du secteur pulvérisé, où l'intensité et la distribution de diamètre de gouttes de la pluie simulée étaient les plus homogènes. L'intensité de la pluie simulée a été évaluée en mesurant le volume de l'eau dans 26 fioles collectrices placées sous le simulateur de pluie pendant 2 minutes. Avec une intensité constante de 40 mm h<sup>-1</sup>, le fonctionnement du simulateur de pluie pendant 3 minutes correspond à un épisode pluvieux de 2 mm.

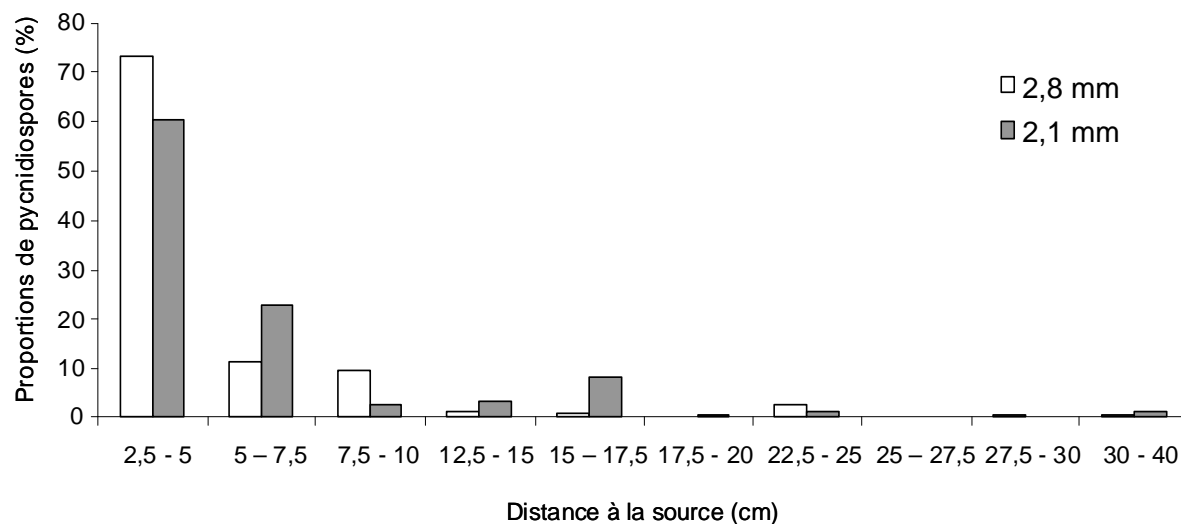
Des résidus inoculés au laboratoire, porteurs de pycnides sporulantes, placés au milieu de plantes pièges et surélevés à la hauteur des feuilles réceptrices (hauteur = 8 cm) ont constitué la source de spores. Des plantes pièges au stade 2 feuilles placées de part et d'autre des résidus, et sur trois rangées de 6 plantes par direction (à 7,5, 12,5 et 17,5 cm de la source) ont constitué la cible des spores libérées par « splashing » (Figure 2.2).

Après une période de séchage à l'air ambiant de 4 heures, les plantes pièges ont été mises à incuber en chambre climatique à 20°C, en condition d'humidité saturante pendant les 72 heures suivant l'épisode pluvieux simulé. Les macules foliaires ont été comptées 14 jours et 21 jours après l'épisode pluvieux simulé.

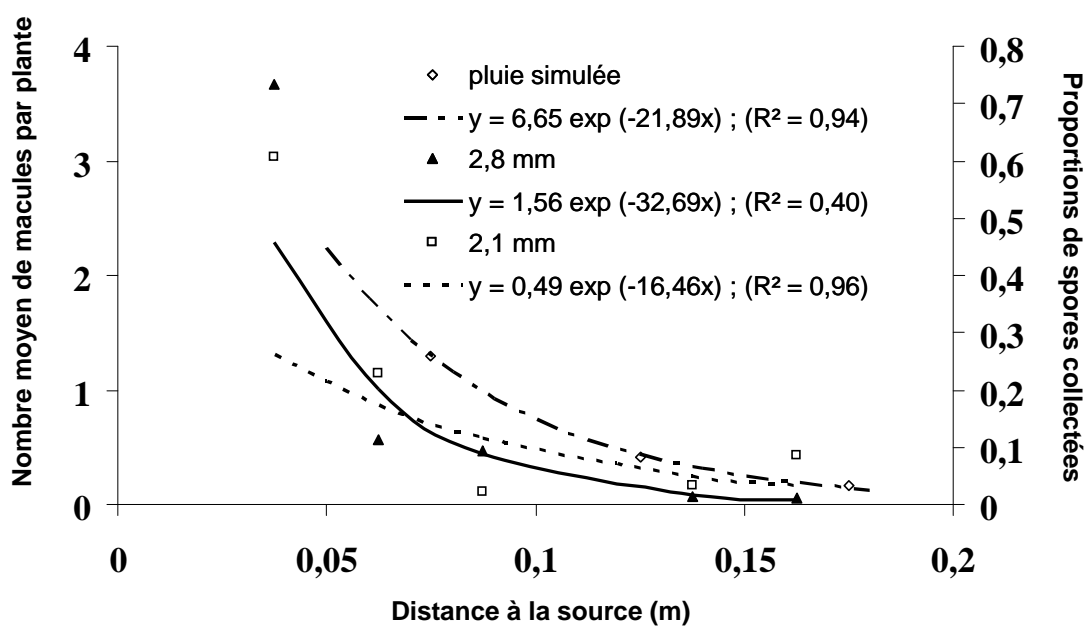
## **3. Résultats**

### **3.1 Mise en évidence expérimentale du phénomène de « splashing » des pycnidiospores de *L. maculans***

L'observation au microscope de pycnidiospores dans les gouttelettes d'éclaboussure récoltées sur lames de verre nous a confirmé que les pycnidiospores étaient libérées et



**Figure 2.3 :** Proportions de pycnidiospores récoltées par classe de distance à la source sous l'action de 15 gouttes incidentes de 2,8 et 2,1mm de diamètre.



**Figure 2.4 :** Modèles exponentiels de dispersion appliqués aux proportions de spores collectées sur 17,5 cm pour les deux diamètres de gouttes incidentes (2,1 et 2,8 mm) et au nombre moyen de macules par plante piège suite à la pluie simulée en fonction de la distance à la source.

transportées sous l'action des gouttes de pluie incidentes, que les pycnides soient portées par des macules foliaires ou par des résidus de culture. Ce mécanisme de dispersion des pycnidiospores se produit dès l'impact de la première goutte incidente pour les deux sources de spores. L'impact des gouttes suivantes continue à libérer des pycnidiospores, ceci jusqu'à la 163<sup>e</sup> et dernière goutte incidente testée (ensemble de ces résultats détaillés dans l'article 1).

### **3.2 Gradient de dispersion des pycnidiospores**

Pour les deux diamètres de gouttes incidentes testés, les proportions de pycnidiospores collectées suite à l'impact de 15 gouttes incidentes ont diminué avec la distance à la source de spores (Figure 2.3). La plupart des pycnidiospores ont été transportées à de faibles distances de la source : l'ajustement d'un modèle exponentiel aux proportions de pycnidiospores collectées en fonction de la distance à la source nous a permis d'estimer que 90 % des pycnidiospores avaient été collectées à moins de 14 cm de la source et 50 % à moins de 4 cm de la source. Néanmoins, des pycnidiospores ont été collectées jusqu'à 40 cm de la source pour les deux diamètres de gouttes incidentes.

### **3.3 Gradient de dispersion de la maladie**

Un épisode de pluie simulée de 2 mm a permis la libération de pycnidiospores à partir de résidus de culture et le transport de ces spores sur des plantes pièges jusqu'à 17,5 cm de la source. Des macules sont apparues sur les plantes pièges 21 jours après la pluie simulée. Un modèle exponentiel a été ajusté au gradient de dispersion de la maladie et comparé au modèle du gradient de dispersion des pycnidiospores réajusté sur 17.5 cm (distance maximale entre les résidus et les plantes pièges sous le simulateur de pluie) (Figure 2.4). La comparaison des pentes de ces gradients de dispersion n'a pas révélé de différences significatives ( $P < 0,05$ ) ; dans l'espace expérimental considéré, la dispersion de la maladie correspond donc à la dispersion des pycnidiospores.

## **4. Conclusions – Discussion**

Nous avons démontré, en conditions de laboratoire, que les pycnidiospores de *L. maculans* étaient dispersées par la pluie sur de courtes distances (jusqu'à 40 cm), des distances similaires à la plupart des champignons dont les spores sont dispersées par la pluie (McCartney *et al.*, 2006), et que le gradient de dispersion de la maladie correspondait au gradient de dispersion des pycnidiospores.



Ces résultats suggèrent qu'au champ, si les plantes sont réceptives et les conditions favorables à l'infection, les pycnidiospores peuvent augmenter la taille de la population fongique par cycles secondaires en augmentant le nombre de plantes infectées et donc de résidus infectés en fin de saison de culture. Elles peuvent aussi permettre l'apparition de foyers de macules sur une même plante. Dans le cas de populations fongiques de petite taille, les cycles secondaires pourraient ainsi augmenter sensiblement les probabilités de rencontre sur une même plante d'individus virulents de types sexuels compatibles initialement distants dans l'espace.

La constatation que des résidus de tige de colza porteurs de pycnides constituaient une source alternative d'inoculum suggère que les pycnidiospores émises à partir de ces résidus pourraient être directement transmises à des plantes de colza semées dans le même champ la saison culturale suivante, sans que le recours à la reproduction sexuée entre les deux saisons de culture soit nécessaire pour transmettre des descendants virulents.

## **5. Perspectives**

Nous avons voulu vérifier en conditions de plein champ si ces conclusions obtenues en conditions contrôlées s'avéraient exactes. Ce complément d'étude au champ fait l'objet du sous-chapitre suivant.



## **DISPERSION PAR LA PLUIE DES PYCNIDIOSPORES DE *LEPTOSPHAERIA* *MACULANS***

### **PARTIE II : Approche complémentaire au champ**

Nous avons démontré expérimentalement l'existence du mécanisme de dispersion par “splashing” des pycnidiospores de *L. maculans*. Initialement postulé à partir d'indices indirects, ce mécanisme de transport des pycnidiospores est toujours considéré négligeable par les épidémiologistes car les cycles secondaires de la maladie ne semblent pas affecter le rendement de la culture de colza (West *et al.*, 2001). Par conséquent, les observations au champ visant à caractériser la nature polycyclique de la maladie ont été très rares (Barbetti, 1976; Hall *et al.*, 1996). Toutefois le potentiel épidémique des pycnidiospores ne devrait pas être sous-estimé, notamment lorsque peu d'ascospores sont émises en début de saison culturale, par exemple lorsque peu d'individus virulents sont présents dans la population pathogène, alors seules quelques ascospores sont capables d'infecter une parcelle de colza où une variété possédant un nouveau gène majeur de résistance vient d'être cultivée.

Dans cette situation le rôle des pycnidiospores pourrait être crucial dans la cinétique du contournement de cette résistance. En effet, les cycles secondaires augmentent le nombre de macules et ainsi la taille de la population virulente. De plus, l'augmentation du nombre de macules accroît la probabilité de rencontre dans la tige d'une même plante de souches des deux types sexuels compatibles (Chapitre 3) et donc la probabilité de reproduction sexuée du champignon et de production d'ascospores. Lorsque la reproduction sexuée est faible, après la survie estivale du mycélium, les pycnidiospores produites sur résidus de culture ou sur les plantules issues du semis de graines contaminées peuvent causer des infections primaires de la maladie et sous des conditions favorables déclencher une épidémie (Barbetti, 1976).

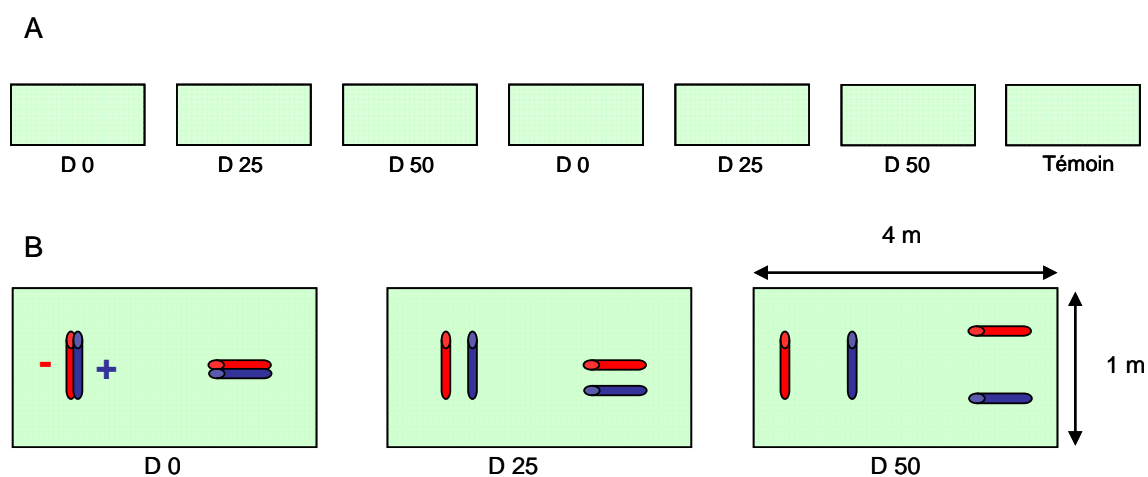
Nous avons entrepris, au cours de la saison de culture de colza 2007-2008, une étude au champ visant à répondre à trois questions :

- Des résidus porteurs seulement de pycnides peuvent-ils être la source d'infections primaires de la maladie ?
- Comment se développe spatialement la maladie à partir de ces infections ?





**Figure 2.5** : Résidu de tige de colza inoculé au laboratoire et apporté sur les parcelles expérimentales. Les pycnides portés par le résidu correspondent aux globules noirs à la surface du résidu et visible sur la photo.



**Figure 2.6** : Dispositif expérimental conçu pour étudier les infections par les pycnidiospores. A: ligne de 7 parcelles de colza implantée sur deux sites expérimentaux; sur chaque ligne 2 répétitions de 3 distances d'espacement entre résidus porteurs de pycnides sont testées et une parcelle de colza témoin sans apport de résidus est suivie. B: Vue détaillée de trois parcelles représentant les trois distances d'espacement entre résidus (0, 25 ou 50 cm) inoculés avec 2 souches distinctes de types sexuels compatibles. Sur chaque parcelle, 2 répétitions de deux résidus sont testées dans deux orientations différentes.

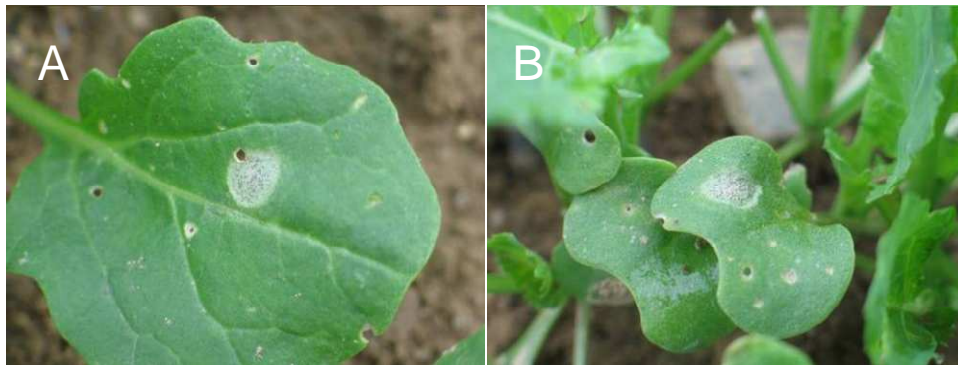
- Si deux individus de types sexuels compatibles sont présents sous forme de pycnides sur des résidus différents, quelle est la distance minimale entre ces résidus permettant la rencontre des partenaires de la reproduction sexuée et donc la formation de pseudothèces et d'ascospores ?

Pour répondre à ces questions, nous avons mis en place des dispositifs expérimentaux nous permettant de contrôler et de suivre au mieux le développement épidémique provoqué par des pycnidiospores, à savoir :

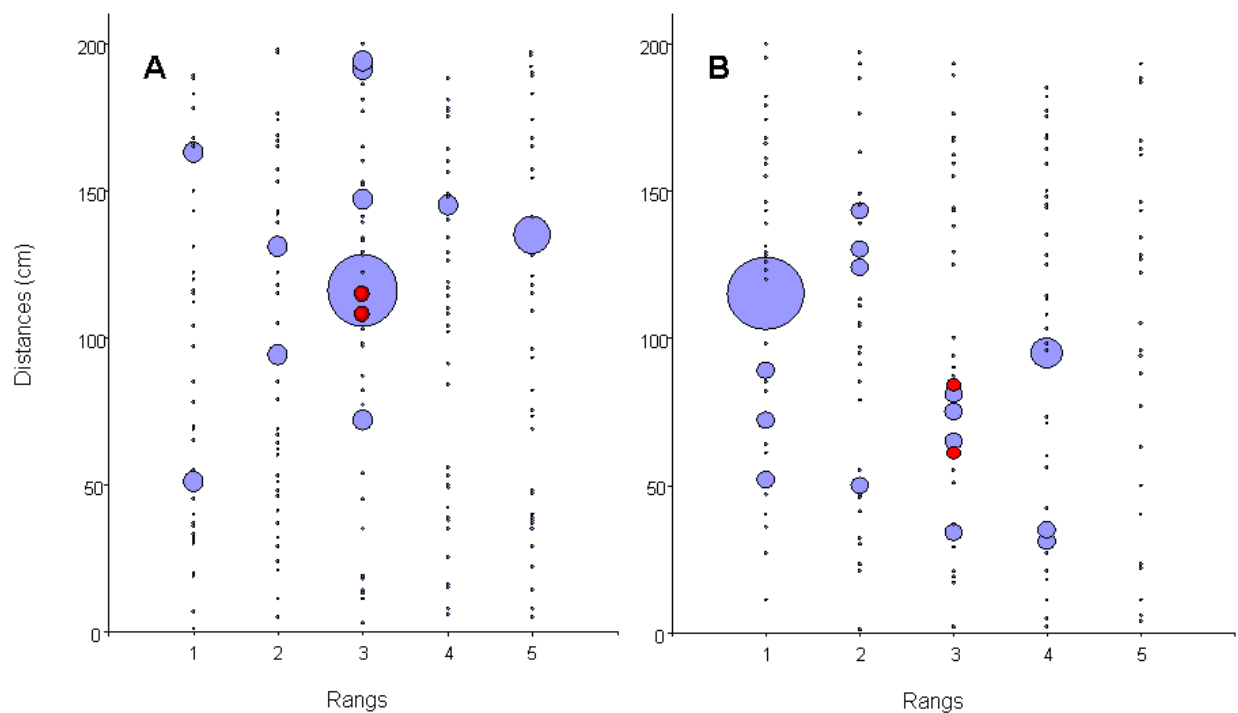
- L'implantation de petites parcelles de colza présentant une résistance majeure (*Rlm6*) non commercialisée dont la virulence correspondante (*avrLm6*) est quasi-absente de la population pathogène naturelle locale. L'étude annuelle de la population pathogène locale permet de confirmer la faible fréquence de la virulence correspondante dans les populations sauvages (Hortense Brun, communication personnelle). Cette condition est préalable pour s'affranchir des contaminations réciproques entre les expérimentations et la population naturelle locale. Les individus que nous avons inoculés sont issus de la population locale par sélection récurrente (Brun *et al.*, 2000) et la destruction totale de tous les résidus de colza présents sur les parcelles en fin de saison permet d'éviter que ces individus virulents subsistent et envahissent la population pathogène locale.
- L'apport de résidus porteurs de pycnides inoculés au laboratoire (méthode décrite dans l'article 1 ; Figure 2.5) avec des souches virulentes de types sexuels compatibles et déjà caractérisées avec des marqueurs moléculaires minisatellites, pour pouvoir reconnaître à quelle souche sont dues les macules foliaires à partir de prélèvements sur plantes infectées.

Le dispositif expérimental est résumé sur la figure 2.6. Des notations régulières et exhaustives sur ces parcelles durant l'automne 2007 nous ont permis de répondre aux deux premières questions comme suit :

- Les pycnidiospores libérées à partir de résidus porteurs de pycnides ont permis l'apparition de la maladie sous forme de macules foliaires sur des plantes situées dans un rayon de un mètre autour des résidus (Figure 2.7)
- La caractérisation génotypique à l'aide de trois marqueurs moléculaires minisatellites des individus responsables des macules foliaires nous a confirmé que ces macules étaient exclusivement causées par les deux isolats apportés sur les résidus



**Figure 2.7 :** Macules foliaire (A) et cotylédonaire (B) issues des infections par les pycnidiospores libérées à partir des résidus de colza porteurs de pycnides.



**Figure 2.8 :** Exemple du développement en agrégats des macules sur deux parcelles expérimentales. Les deux résidus de culture inoculés au laboratoire et porteurs de pycnides correspondent aux deux points rouges sur chaque parcelle. A : les résidus sont juxtaposés. B : les résidus sont séparés par 25 cm. Les rangs de colza sont séparés par 15 cm entre eux. L'emplacement des plantes correspond aux cercles bleus. Le diamètre des cercles bleus est d'autant plus grand que la plante correspondante porte de macules, et le plus petit diamètre correspond à des plantes sans macules.

- Le développement spatial de la maladie à partir de ces résidus porteurs de pycnides semble se faire de manière agrégée autour de la source de spores (Figure 2.8)

A partir des plantes avec macules foliaires repérées durant l'automne 2007, les observations des résidus de tige de colza et du type de fructifications (pycnides et/ou pseudothèces) après la récolte du colza nous permettront de savoir quelle répartition spatiale des résidus (adjacents, distants de 25 cm ou de 50 cm) permet la rencontre et la reproduction sexuée de souches compatibles.



## Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape

R. Travadon <sup>a\*</sup>, L. Bousset <sup>a</sup>, S. Saint-Jean <sup>b</sup>, H. Brun <sup>a</sup> and I. Sache <sup>c</sup>

<sup>a</sup> INRA-Agrocampus UMR Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes, Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France

<sup>b</sup> INRA-INA PG UMR Environnement et Grandes Cultures, 78850 Thiverval Grignon, France

<sup>c</sup> INRA-INA PG UMR Epidémiologie Végétale, BP 01, 78850 Thiverval Grignon, France

### Abstract

The fungus *Leptosphaeria maculans* causes blackleg (phoma stem canker), one of the most serious diseases of oilseed rape. The role of pycnidiospores produced during asexual reproduction is poorly documented and limits the understanding of the pathogen's population dynamics. The objectives of this study were to assess rain-splash dispersal of pycnidiospores of *L. maculans* from phoma leaf spots, and transmission of the disease from oilseed rape stubble carrying pycnidia. The work was conducted in still air with either a drop generator or a rain simulator. The impact of simulated incident drops on phoma leaf spots resulted in the dispersal of *L. maculans* pycnidiospores within splash droplets. Ninety per cent of the spores were collected within 14 cm of the source and a few were regularly observed up to 40 cm. Pycnidiospores produced on oilseed rape stubble and dispersed by simulated rain infected oilseed rape trap plants in a spatial pattern that matched the spatial dispersal of the pycnidiospores. In the field, rain-splash dispersal of pycnidiospores could increase the pathogen population and may enhance sexual reproduction by facilitating the mating of initially spatially separated isolates of opposite mating type.

**Keywords:** *Brassica napus*, dispersal gradient, *Phoma lingam*, quantitative epidemiology, rain-splash



## 1. Introduction

Phoma stem canker (blackleg) caused by the fungus *Leptosphaeria maculans* (anamorph *Phoma lingam*) is a world-wide disease of oilseed rape (*Brassica napus*, *B. rapa* and *B. juncea*), causing serious losses in Europe, Australia and North America (Fitt *et al.*, 2006). The disease is initiated by airborne ascospores, released from pseudothecia on infested oilseed rape stubble, that produce phoma leaf spots in autumn (McGee, 1977; Hall, 1992; West *et al.*, 2001; Howlett, 2004). Initial leaf infections are followed by systemic growth of the fungus via the leaf petiole to the stem where stem canker develops, and in severe cases, causes lodging and death of the plant (Hammond & Lewis, 1987; Xi *et al.*, 1991; West *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2004). Pycnidiospores are produced in abundance within phoma leaf spots and are involved in the localized spread of disease (Barbetti, 1976). However the disease is generally regarded as monocyclic (West *et al.*, 2001) and the importance of pycnidiospores has not been quantified.

Pycnidiospores are cylindrical and hyaline and measure  $3\text{--}6 \times 1.5\text{--}2 \mu\text{m}$  (Smith & Sutton, 1964). They are contained in black, globose and ostiolate pycnidia produced in necrotic lesions (phoma leaf spots) of recently killed tissue; under suitable environmental conditions, pycnidiospores exude through pycnidial ostiole in red or pinkish mucilage (Boerema, 1976; Williams, 1992). Pycnidiospores of *L. maculans* display typical characteristics of splash-borne spores (Fitt *et al.*, 1989), and are believed to be exclusively dispersed by rain-splash (Salisbury *et al.*, 1995; Howlett *et al.*, 2001). This hypothesis is confirmed in the field by the association of peaks of pycnidiospores counts with rain events (Guo & Fernando, 2005). In places with no observed ascospores contamination, fields monitored during a growing season revealed pycnidiospores dispersal by detecting blackleg spread up to 216 cm from plants grown from blackleg infected seeds (Hall *et al.*, 1996), and up to 105 cm from inoculated rows (Barbetti, 1976). This passive dispersal during rain events is therefore, putatively, the only dispersal mechanism for pycnidiospores. This mechanism and the resulting spread of disease have not been investigated yet in detail under controlled conditions. Rain simulators or simulated raindrops are commonly used to study the splashing of fungal spores and has provided techniques for understanding the mechanisms involved (Fitt *et al.*, 1989; Madden, 1992; Geagea *et al.*, 1999).

The role of secondary infections by pycnidiospores of *L. maculans* could be more important than currently believed. This mechanism could increase the size of the population, and may facilitate the mating of isolates of opposite mating type which are initially spatially separated. These two processes can be important for pathogen-population dynamics (McDonald & Linde, 2002). For this reason a better understanding of the pycnidiospore splash dispersal mechanism is required. The objectives of this study were: (i) to demonstrate under controlled





conditions that rain-splash is an effective dispersal mechanism of pycnidiospores of *L. maculans* from phoma leaf spots and from oilseed rape stubble, (ii) to characterize in still air the dispersal gradient of pycnidiospores from phoma leaf spots following the impact of incident water drops, and (iii) to characterize the disease gradient resulting from a simulated rain event on pycnidiospore-bearing stubble.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Pycnidiospores dispersal gradients

#### 2.1.1 Pycnidiospores sources

Leaves of oilseed rape (*Brassica napus*, cv. Drakkar) with phoma leaf spots, and oilseed rape stubble of unknown cultivar were sampled in the field. Phoma leaf spots were cut from the leaves and categorized according to the number of pycnidia per leaf spot (0-50, 50-100, 100-150, or 150-200). The spore content of the pycnidia was estimated by vortexing 10 phoma leaf spots from each category in 0.5 mL water and counting the pycnidiospores with a haematocytometer (Malassez cell) under an optical microscope (Leitz® Dialux 22, magnification  $\times 400$ ).

#### 2.1.2 Drop generator

A water drop generator consisting of a 20 mL syringe (Terumo®) was filled with lactophenol cotton blue (LCB) solution (15%) and connected to a vertically-oriented hypodermic needle (Terumo®). The stain was required to visualize both the splash droplets collected and the pycnidiospores within these droplets. It was assumed that the addition of LCB not to change the physical properties of the liquid from that of water. The volumes of the drops generated by two needles (Terumo®, NN-1938R and NN-2516R) were measured by collecting and weighing six series of 100 drops. Spherical drops were assumed and the diameters estimated as 2.1 mm for NN-1938R (small) and 2.8 mm for NN-2516R (large), which simulated a sample of drop sizes of natural rainfall (Ulbrich, 1983). Since kinetic energy depends mainly on drop diameter, variation in the physical properties of the two drop sizes could be tested. In all experiments, drops were released from a vertical height of 1 m to demonstrate the mechanism of splashing, even if drops released from this height do not reach the terminal velocity of natural rain drops (Geagea *et al.*, 1999). Liquid flow through the syringe and the number of drops released was controlled manually to produce drops of consistent diameter.



### **2.1.3 Pycnidiospore removal threshold from phoma leaf spots and infected stubble**

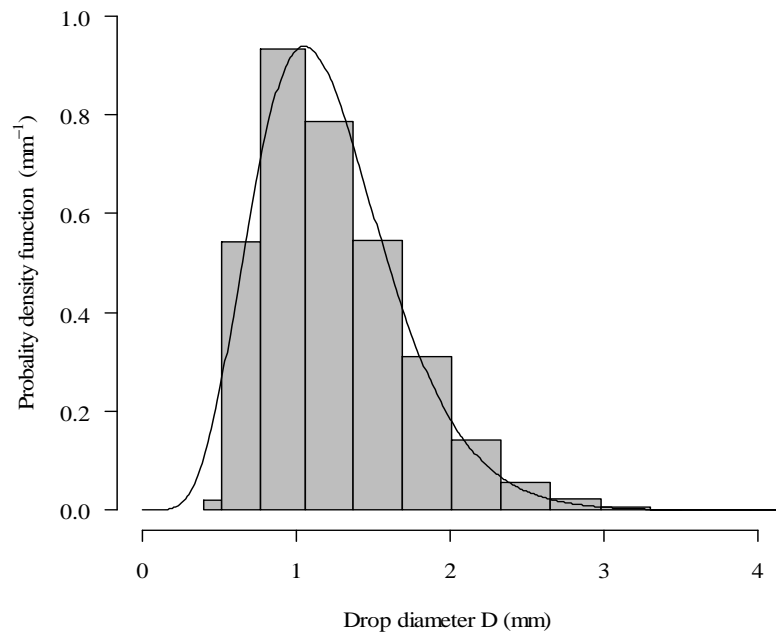
A phoma leaf spot measuring between 1.5 and 2 cm in diameter surrounded with 2-3 mm uninfected leaf tissue and bearing 150-200 pycnidia was placed horizontally under the drop generator and submitted to incident drops (2.8 mm diameter). The resulting splash droplets were collected on two glass slides (76 x 26 mm) laid horizontally 2.5 cm from the spore source in opposite directions. The slides were changed after each incident drop and checked for splash droplets under an optical microscope (Leitz® Dialux 22, magnification  $\times 400$ ). The pycnidiospore removal threshold, i.e the minimal number of incident drops required to remove and transport pycnidiospores, was achieved as soon as one spore-bearing splash droplet was observed. The experiment was repeated with ten phoma leaf spots and the same protocol was applied to ten infected stubbles measuring about 25 cm in length and 2 cm in diameter.

### **2.1.4 Pycnidiospore depletion from phoma leaf spots**

Phoma leaf spots bearing either 0-50 or 150-200 pycnidia were exposed to large drops as described above. The dispersed spores were collected on two glass slides laid horizontally 2.5 cm from the spore source in opposite directions. Groups of three drops were released at regular intervals (1-3; 11-13; 21-23; 61-63; 101-103; 141-143). Splash droplets that occurred between these numbered drops were not considered. The numbers of pycnidiospores were counted for the splash droplets. The experiment was repeated with five phoma leaf spots for each of the two leaf spots categories.

### **2.1.5 Pycnidiospore dispersal gradients**

Phoma leaf spots bearing 150-200 pycnidia were exposed to both small and large drops released in sequences of 15 drops. Splash droplets were collected on glass slides laid horizontally in two opposite directions from the spore source, so that the nearest slide was 2.5 cm from the source and the most distant slide 32.8 cm from the source. A regular interval of 2.5 cm was maintained between slides. The extent of the droplet collection area (from 2.5 to 40.6 cm from the source) was determined by preliminary experiments which showed that no splash droplet was collected beyond 40 cm from the source. Glass slides were not placed within 2.5 cm of the source in order to not alter the counting by possible leakage of liquid accumulated on the source near to the glass slide. Because every splash droplet contained pycnidiospores only a subsample of droplets were counted. Each slide was divided longitudinally into three 2.5 cm widths, and a minimum of three droplets was counted per zone, resulting in enumeration of spores in a minimum of nine splash droplets per slide. The splash droplets enumerated reflected all of the droplets of a slide zone. Splash droplets collected on a given section of the slide were assumed to have travelled the distance from



**Figure 2.9:** Drop probability density function of the rain simulator (bars), measured by an optical disdrometer. The solid line corresponds to the fit of the experimental data upon Ulbrich's (1983) diameter distribution of natural rain.

the source to the centre of the section. The number of pycnidiospores in un-enumerated droplets was estimated by multiplying the droplet area by the mean pycnidiospore concentration of the enumerated droplets in the same section of the slide. Cartesian coordinates and the area of every LCB coloured droplet present were determined by analysis of photographs of each slide using image analysis software Assess® (Image Analysis Software for Plant Disease Quantification, APS Press, 2002). The experiment was repeated with five phoma leaf spots for each drop size.

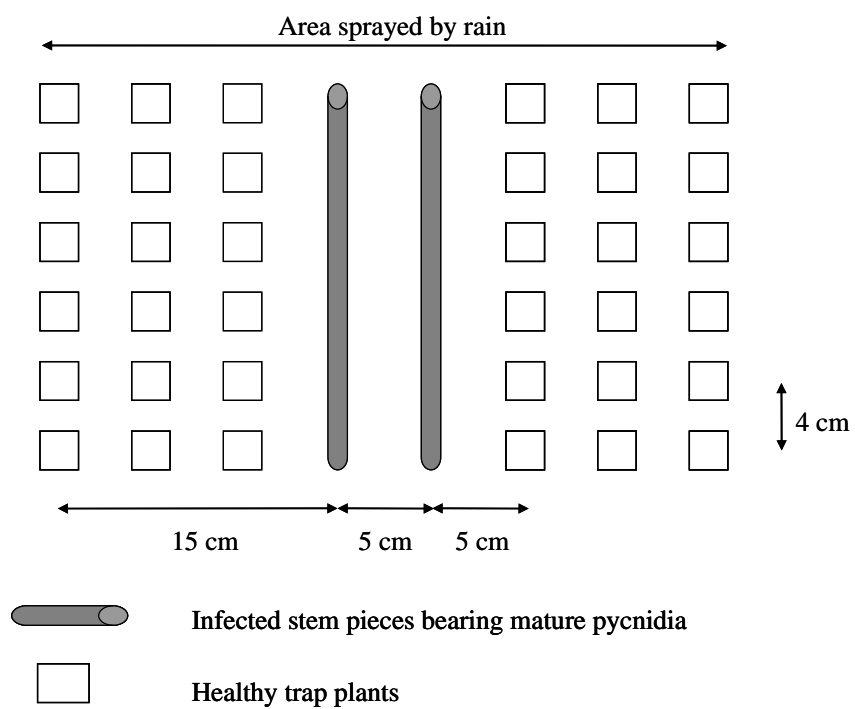
## **2.2 Disease dispersal gradients**

### **2.2.1 Pycnidiospore sources**

Eight pieces of mature healthy oilseed rape stem (collected in the field from an unknown cultivar) were autoclaved twice, 24 h apart, for 20 min at 120°C in Roux bottles with 100 mL of distilled water. The bottles were autoclaved a third time at 115°C for 20 min 24 h after addition of 50 mL V8-juice medium. A single ascospore isolate of *L. maculans* (FCr3), originally obtained from one oilseed rape stubble collected in 1990 in Saint-Pathus, France, was used as the inoculum source. Spherical fungal explants of 5 mm diameter on malt medium were cut from the margin of actively growing colonies, and placed on the oilseed rape stems in the Roux bottles, two explants per stem separated by 10 cm. Optimum pycnidiospore production was obtained by incubating the bottles horizontally for 12 days at 18°C under a 12-h photoperiod 300-400 nm (OSRAM L40 W/75 lamps 40 cm above the culture bottles).

### **2.2.2 Rain simulator**

The Deltalab Microprocessor Controlled Spray System, EID 330, manufactured by Orstom (Asseline & Valentin, 1978), was used to simulate rain events in still air. Rainfall was simulated by a constant speed oscillating nozzle (Deltalab, Tec Jet SS 6560) with a sweep angle of 180° positioned at a height of 3.8 m. Water pressure at the nozzle orifice was 62 kPa. All subsequent measurements were made within the square meter in the centre of the area sprayed, where intensity and drop diameter distribution of the simulated rain were the most homogenous. The intensity of the simulated rain was assessed by measuring the volume of water collected in 26 vials placed at random under the rain simulator for 2 min. With a constant intensity of 40 mm h<sup>-1</sup>, operation of the rain simulator for 3 min equalled a 2 mm rainfall event. The probability density function (Fig. 2.9) of drop diameters produced by the nozzle at 62 kPa water pressure was obtained from an optical single-beam disdrometer (CETP). This probability density function was compared to that of natural rainfall by using Ulbrich's characterisation of rain:



**Figure 2.10:** Schematic layout of infection source (shaded rolls: diseased oilseed rape stems) and trap plants (boxes) in the experiment with the

$$N(D) = N_0 D^\mu \exp(-\Lambda D),$$

$$\Lambda = \frac{(3.67 + \mu) R^{\frac{1}{4.67 + \mu}}}{10\varepsilon}, \quad (\text{Eqn. 1})$$

D (mm) = drop diameter, R (mm h<sup>-1</sup>) = rain intensity,  $N_0$ ,  $\mu$  and  $\varepsilon$  are rain characteristic depending of the type of rain (such as thunderstorm, showers, etc.).

By using nonlinear equation fitting (Eqn. 1) on the rain simulator drop probability density function, we found  $\mu = 6.291 \pm 0.655$  and  $\varepsilon = 0.119 \pm 0.010$  with  $P < 0.001$  ( $t$ -test).

According to Ulbrich (1983), such parameters correspond to natural rain showers. Mean drop velocity at ground level was also measured by the disdrometer and was found to be 5.02 m s<sup>-1</sup> which is slightly higher than the corresponding natural rain (4.38 m s<sup>-1</sup> for the same  $\mu$  and  $\varepsilon$ ).

### 2.2.3 Disease dispersal gradients

Horizontal disease dispersal from infected stubble was assessed by collecting the spore-bearing splash droplets on trap plants placed at various distances from the source. The trap plants were susceptible oilseed rape plants (cv. Westar) at the two-leaf stage grown in a batch (30 x 44 x 10 cm) filled with a mix of 40% blond peat, 20% black peat, 20% sand and 20% topsoil (silt and clay) (Terreaux Armoricaains). Plants were grown in a glasshouse at 20°C under a 16-h photoperiod and planted into 2 x 3 parallel rows (six plants per row, 4 cm apart) at 5, 10 and 15 cm from the position of the infected stubble. Two pieces of infected stubble were placed at the height of the leaves in the centre of the batch (Fig. 2.10) and exposed to a simulated 2 mm rain event. After each simulated rain event, the trap plants were allowed to dry for 4 h at ambient temperature (18°C). Trap plants were then incubated in a growth chamber at 20°C with a 16h photoperiod and saturated humidity. The number of phoma leaf spots was counted on all trap plants for each batch 21 days after the simulated rain event.

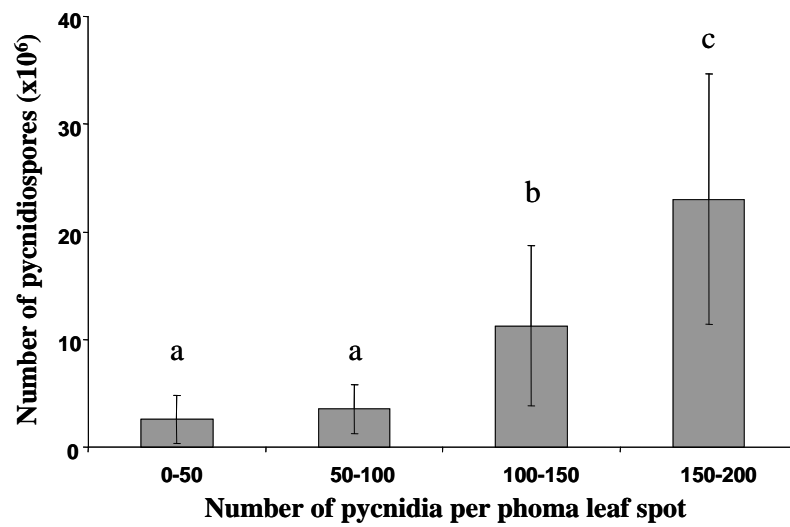
### 2.2.4 Statistical analysis of the experimental spore and disease gradients

An exponential equation was fitted for spatial experimental gradients, (Kiyosawa, 1972; Fitt *et al.*, 1987):

$$y = a \cdot \exp(-b \cdot d) \quad (\text{Eqn. 2})$$

where  $y$  is either the proportion of spores (spore dispersal gradient) or the number of phoma leaf spots counted on trap plants (disease dispersal gradient) recorded at distance  $d$  (cm) from the source.





**Figure 2.11:** Number of pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* borne by phoma leaf spots according to the number of pycnidia per symptom. Means and standard errors of ten repetitions are presented. Means followed by the same letter are not significantly different according to the *F*-test ( $P < 0.05$ ).

For spore dispersal gradients, parameters  $a$  (intercept) and  $b$  (slope) were estimated by regression after linearization of equation (Eqn. 2):

$$\ln(y) = \ln(a) - b.d \quad (\text{Eqn. 3})$$

The distance from the source at which the proportion of counted pycnidiospores decreased by 50% and 90% was calculated as  $\alpha = -\ln(0.5) / b$  and  $\alpha' = -\ln(0.1) / b$ , respectively.

For disease dispersal gradients, the parameters  $a$  and  $b$  were estimated by non linear regression between the number of phoma leaf spots and the distance from the source (SAS Institute Inc.), assuming that the source of pycnidiospores was at the centre of the two stubble pieces. This nonlinear regression method was used because of the great number of trap plants without symptoms (i.e. a null  $y$ ).

The confidence interval (IC) of the slope parameter ( $b$ ) was calculated as:

$$\text{IC} = b \pm se \ t(P/2; n-2) \quad (\text{Eqn. 4})$$

In order to test equalities for slope values between experimental gradients, confidence intervals for slope differences between gradients were calculated as:

$$\text{IC} = (b_1 - b_2) \pm se \ t(P/2; n_1 + n_2 - 4) \quad (\text{Eqn. 5})$$

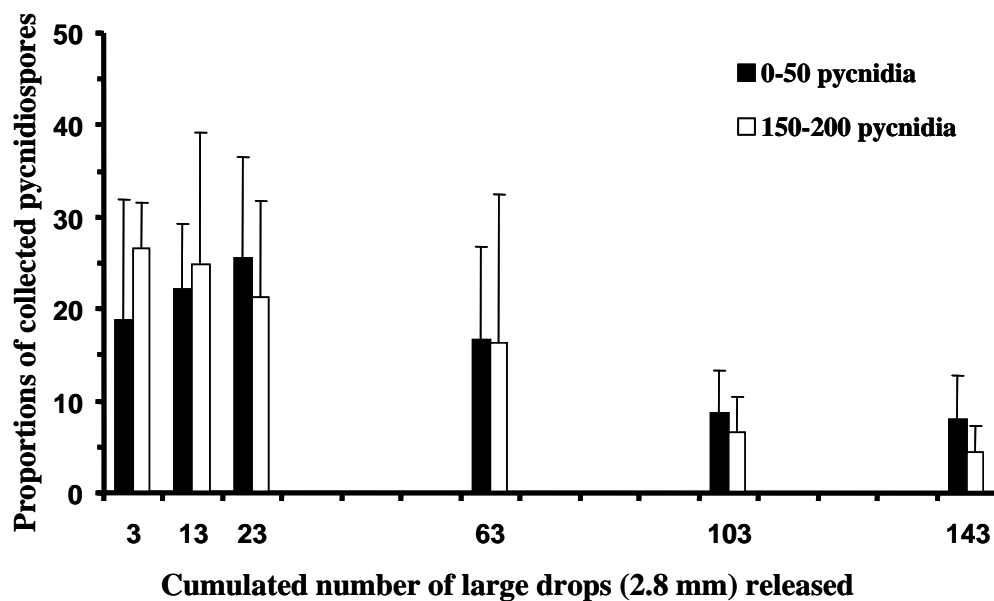
### 3. Results

#### 3.1 Numbers of pycnidiospores borne by phoma leaf spots

The mean number of pycnidiospores for each class of pycnidia-bearing leaf spots (0-50; 50-100; 100-150; 150-200 pycnidia) increased with the number of pycnidia per leaf spot (Fig. 2.11). The number of spores per pycnidium was relatively constant and was not related to the number of pycnidia per leaf spot. From an analysis of variance (ANOVA), the spore content was not significantly different ( $F$  test,  $P < 0.05$ ) between the two lowest classes of leaf spots. Significant differences were found between the 100-150 and the 150-200 pycnidia classes, as well as between the 50-100 and the 100-150 pycnidia classes. Leaf spots bearing 100-150 pycnidia showed a good compromise between the quantity and the variability of their spore load, and were therefore used as the spore source to characterize pycnidiospores horizontal dispersal gradients.

#### 3.2 Pycnidiospore removal threshold

Pycnidiospores were removed and transported in splash droplets with the first drop from pycnidia borne either by phoma leaf spots or by oilseed rape stubble. Ten repeated experiments were conducted using large drops for both spore sources namely phoma leaf spots and stubble.



**Figure 2.12:** Effect of increasing number of large (2.8 mm) incident drops released from a height of 1 m on *Leptosphaeria maculans* pycnidiospore depletion from two groups of phoma leaf spots (0–50 pycnidia and 150–200 pycnidia.). Collecting slides were in place during each sequence of three drops. Means and standard errors of five repetitions are presented. Bars represent the mean total number of pycnidiospores counted in all the splash-droplets deposited on the two glass slides after each sequence of three incident drops.

**Table 2.1:** Numbers (n) and proportions (%) of pycnidiospores from *Leptosphaeria maculans* removed and collected from each phoma leaf spot (*Pls*1 to 5) on oilseed rape, after the release of 15 incident water drops of diameter D from a height of 1 m

D(mm)		<i>Pls 1</i>	<i>Pls 2</i>	<i>Pls 3</i>	<i>Pls 4</i>	<i>Pls 5</i>	Total
2.8	n	866	908	2,119	8,047	7,080	19,020
	%	4.6	4.8	11.1	42.3	37.2	100
2.1	n	570	172	2,225	17,095	3,234	23,298
	%	2.4	0.7	9.6	73.4	13.9	100

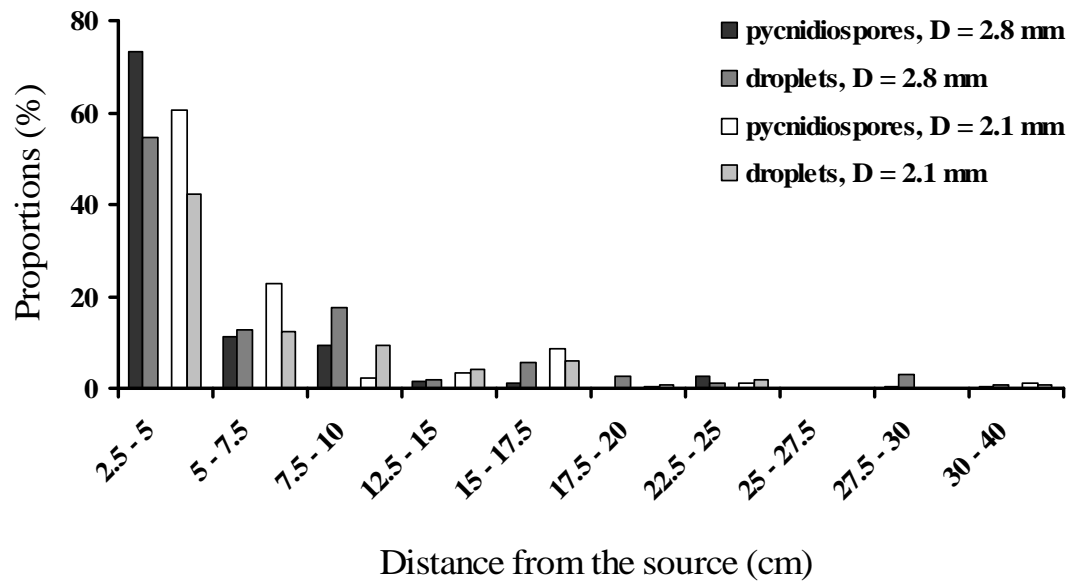
### 3.3 Pycnidiospore depletion from phoma leaf spots

Splash droplets containing removed pycnidiospores were collected after the impact of 143 large drops onto phoma leaf spots bearing either 0-50 or 150-200 pycnidia (Fig. 2.12). Most pycnidiospores were removed after the first 63 drops for both categories of leaf spots. Splash droplets resulting from the impact of the 1st-3rd, 11th-13th, or 21st-23rd drops contained pycnidiospores, whereas the first splash droplets collected that did not contain pycnidiospores were observed after the impact of the 61st-63rd drop for both categories of leaf spots. Therefore, a series of 15 drops were released to characterize pycnidiospore horizontal dispersal gradients.

### 3.4 Pycnidiospore horizontal dispersal gradients

The number of pycnidiospores in the rain-splash droplets was estimated after the impact of the first 15 drops for both drop sizes on five phoma leaf spots (called *Pls 1* to *Pls 5*). Surprisingly the total number of pycnidiospores collected was greater after the impact of the small (23,928) than the large (19,020) drops (Table 2.1). This result can be explained by the great number of pycnidiospores removed from a single leaf spot (*Pls4*) tested with the small drops.

For each drop size, the proportion of pycnidiospores collected after the impact of 15 drops decreased with increasing distance from the source (Fig. 2.13). The proportion of pycnidiospores collected peaked between 2.5 and 5 cm from the source both for the large and small drops. Less than 250 pycnidiospores were recorded beyond 10 cm of the source for either drop size, although they were still observed at 30-40 cm, the greatest distance interval measured. Beyond 10 cm from the source, pycnidiospores were not found at all distance intervals. In order to fit the linearized exponential model to the observed spore dispersal gradient, it is assumed that these intervals had received 0.001% of the total number of pycnidiospores collected (Campbell & Madden, 1990). The number of pycnidiospores collected at the 5-10 cm distance interval was much higher for the small drops than the large. However, phoma leaf spots bearing unexpectedly high numbers of pycnidiospores (*Pls4*) strongly biased the average after the impact of the small drops. Conversely, certain distance classes exhibited small peaks in spore counts, which corresponded to splash droplets of large diameter (approximately 1 mm). Moreover, the impact of the small drops on *Pls4* leaf spot resulted in large splash droplets of up to 21 mm in diameter at 7.5-10 cm. The small peaks (low spore counts) observed 7.5-10 cm can be explained by the integration of the area of the drops and the method of enumeration. When spore counts of *Pls4* phoma leaf spot were excluded from the analysis, the proportion of pycnidiospores recorded decreased sharply for distances greater than 10 cm from the source



**Figure 2.13:** Proportion of splash droplets and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* recorded and distance travelled from the source. Both were collected under the action of 15 drops of both diameters (2.8 mm and 2.1 mm) from a height of 1 m.

**Table 2.2:** Parameters obtained by fitting Eqn. (2) to the relationships between proportions of pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* or numbers of phoma leaf spots ( $y$ ) collected or trapped under the action of incident drops of diameter  $D$  or simulated rain of 2 mm, and distance ( $x$ ) ( $x$  in first column, two intervals used for comparison).  $\alpha$  is the 'half-distance' where  $y$  decreases by half,  $\alpha'$  is the distance where  $y$  decreases by 90%, and the standard error (se) followed by confidence intervals for values of slopes  $b$ .  $R^2$  is the coefficient of determination of the exponential model.

x (cm)	D (mm)	b (se) +/- (m-1)	$\alpha$ (cm)	$\alpha'$ (cm)	$R^2$
0 to 40	2.8	-16.65 (4.5) +/- 8.37	4	14	0.63
	2.1	-16.14 (4.9) +/- 9.17	4	14	0.57
0 to 17.5	2.8	-32.69 (6.8) +/- 10.6	2	7	0.94
	2.1	-16.46 (14.52) +/- 27.5	4	13	0.4
Rain simulator		-21.89 (5.5) +/- 10.8	3	11	0.96

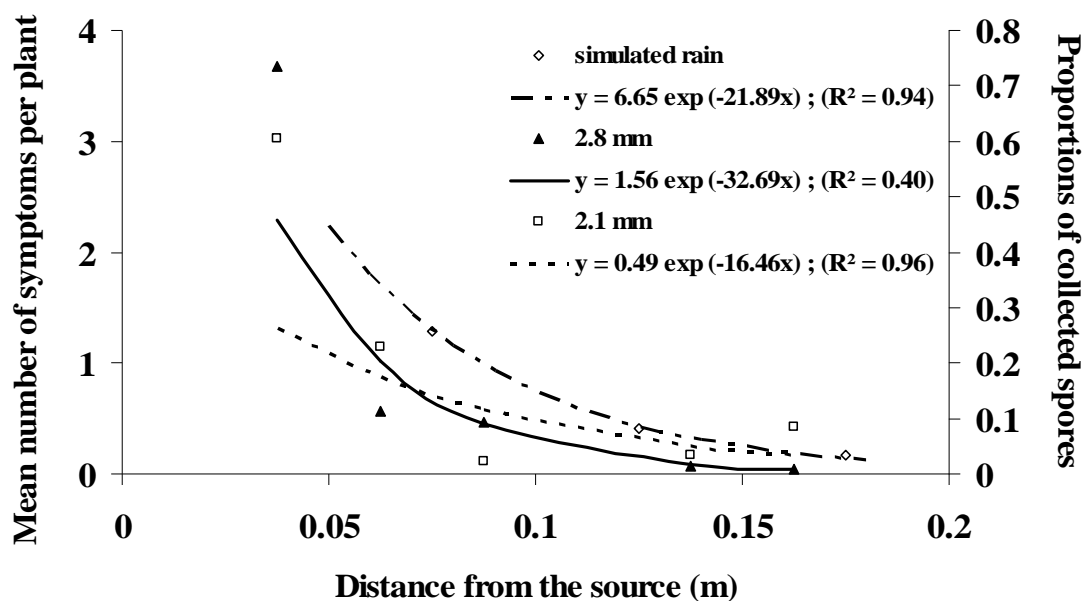
and the proportion of pycnidiospores recorded within 15 cm of the source was lower for the small drops than the large (Fig. 2.13).

Most of the pycnidiospores that were impacted by the simulated rain drops were transported only at short distances; i.e. 94% of the pycnidiospores were recorded within 10 cm of the source for the large drops and 86% for the small (Fig. 2.13). At the 2.5-5 cm distance interval, 73% of the pycnidiospores were collected for the large drops and 60% for the small. The proportion of splash droplets collected at each distance interval followed a similar distribution to that of the proportion of removed pycnidiospores (Fig. 2.13). Differences observed between the distributions reflect variation in the area of the splash droplets.

The exponential model explains 63% ( $R^2 = 0.63$ ,  $P < 0.05$ ) of the variation observed for the spore dispersal gradient of the large drops and 57% ( $R^2 = 0.57$ ,  $P < 0.05$ ) for the small, excluding the *Pls4* leaf spots (Table 2.2). The high proportion of pycnidiospores-carrying droplets collected between 2.5 and 5 cm of the source (Fig 2.13) revealed a very rapid reduction in the number of pycnidiospores recorded within 5 cm of the source and explained the major portion of the variance unaccounted by the model. Model parameters and the derived 50% (half) and 90%-distances were estimated (Table 2.2). The slope of the gradient ( $b$ ) did not significantly differ between the drop sizes (confidence interval for the difference between slopes: IC = [- 14.66; 13.63],  $t = 2.120$ ,  $P = 0.05$ , 16 df). Estimation of the travel distances confirmed that most of the pycnidiospores were collected very close to the source: the 50% (half-distance) and 90%-dispersal distances did not exceed 4 cm and 14 cm, respectively.

### 3.5 Disease dispersal gradients

A simulated 2 mm rain shower was able to remove pycnidiospores from infected oilseed rape stubble and transport them to trap plants up to 17.5 cm from the source. Twenty-one days after infection, the trap plants exhibited a total of 45 phoma leaf spots. An exponential function was fitted to the experimental disease dispersal gradients (Table 2.2). For comparison of spore and disease dispersal on the same scale, the pycnidiospore dispersal gradients were re-estimated (Table 2.2) using only the spore counts up to 17.5 cm from the source (maximum distance between stubble and trap plants for disease dispersal gradients). The slopes estimated for the two drop sizes did not differ significantly (confidence interval for the difference between of slopes: IC = [- 38.35; 8.28],  $t = 2.776$ ,  $P = 0.05$ , 4 df). The slopes of the disease and spore dispersal gradients evaluated up to 17.5 cm from the source did not differ significantly for either drop size (confidence intervals for the difference between slopes:



**Figure 2.14** Exponential dispersal models applied to observed proportions of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores ( $y$ ) collected at distances ( $x$ ) up to 17.5 cm from the source under the action of 15 large (2.8 mm) incident drops ( $\blacktriangle$  for proportions and — for the exponential model) or small (2.1 mm) incident drops ( $\square$  for proportions and - - - for the exponential model). These models were compared with the exponential dispersal model applied on observed mean numbers of symptoms exhibited by trap plants ( $y$ ) developed at distances ( $x$ ) up to 17.5 cm from the source of spores ( $\diamond$  for mean numbers of symptoms and - — - — for the exponential model).

( $t = 3.182$ ;  $P = 0.05$ ; 3 df), both for the large drops: IC = [-42.12; 13.25] or for the small: IC = [-57.64; 41.06]) (Fig. 2.14).

#### 4. Discussion

This study clearly described the rain-splash mechanism for *L. maculans* pycnidiospore dispersal but further work is needed to assess this dispersal mechanism and its role in the spread of blackleg disease in field conditions. Ascospore infection is considered to be of major importance in initiating disease epidemics, because ascospores and pycnidiospores have different infection requirements. Ascospore germination, penetration and development of symptoms on cotyledons can occur up to two days earlier than for pycnidiospores (Li. *et al.*, 2004). Furthermore fewer ascospores than pycnidiospores are required to produce infection (Wood & Barbetti, 1977). Yet it has been shown that under controlled conditions, co-inoculation with ascospores increased the ability of pycnidiospores to cause disease compared with pycnidiospores alone (Li *et al.*, 2006). Pycnidiospore infections could also have a major role during the growing season when there are only few ascospores available.

During the process of splash-dispersal of pycnidiospores, the immediate release of pycnidiospores from pycnidia is partly explained by the morphology of the fructifications of *L. maculans*. Pycnidiospores are released through an ostiole when relative humidity is close to saturation. The closer to the surface of the host tissue the pycnidia is situated, the less energy is required to extract the spores (Rapilly, 1991). Pycnidiospores are exuded from pycnidia in a mucilage (Williams, 1992). Retention of pycnidiospores in the mucilage may explain the incomplete spore depletion from pycnidia as was shown for *Phaeosphaeria* (*Septoria*) *nodorum*, which possess similar fructifications (Rapilly, 1991). Under field conditions during rain events, pycnidiospore dispersal is expected to occur rapidly. However, during epidemics, exhaustion of pycnidiospores from pycnidia within phoma leaf spots should not be a limiting factor of secondary disease cycles.

The number of pycnidiospores per leaf spot varied between  $2.6 \times 10^6$  and  $23.0 \times 10^6$  among the four categories of leaf spots assessed (Fig. 2.11). In this study, the strength of the spore source was standardized by using phoma leaf spots bearing 100-150 pycnidia. Within this category, differences observed in the spore loads of the leaf spots may indicate differences in pycnidia maturation since the source of spores used to characterize pycnidiospore dispersal gradients were heterogeneous. Although the strength of a source affects the amount of disease and therefore alter the constant  $a$  in the regression equation (Gregory, 1968), we decided to exclude *Pls4* tested with the small drop diameter (2.1 mm) from the





analysis because the number of pycnidiospores recorded from this spot was on average ten times greater than those observed from the four other spots tested with the same drop diameter.

The slopes of the experimental dispersal gradients obtained from the two drop sizes did not differ significantly. These results are in agreement with those of other studies which have reported that the slope of the spore splash dispersal gradient did not significantly differ with drop characteristics such as diameter and velocity (Geagea *et al.*, 1999; S. Saint-Jean, personal communication).

Pycnidiospores were observed to be dispersed by rain-splash over short distances from the source (e.g. a half-distance of 4 cm) and these distances were similar to the travel distances reported for other splash-borne fungi. For other conidial spores, half-distance of dispersal obtained in still air is 5-9.8 cm for *Pseudocercospora capsellae* (Fitt *et al.*, 1992); 7 cm for *Oculimacula* (anamorph *Pseudocercospora*) *herpotrichoides*, 10 cm for *Pyrenopeziza brassicae* and 11 cm for *Septoria nodorum* (Fitt *et al.*, 1987); 15 cm for *Asochyta fabae* f. sp. *lentis* (Pedersen *et al.*, 1994); 10.5-13.6 cm for *Fusarium culmorum* and 9.2-16.5 cm for *F. avenaceum* (Jenkinson & Parry, 1994); and 7.7-14.7 cm for *F. poae* (Horberg, 2002). As demonstrated in previous studies (Fatemi & Fitt, 1983; Horberg, 2002), it is assumed that the distance does not depend on spore morphology. Comparing this half-distance with the similar half-distance of *P. capsellae* spores splash-dispersed from white leaf spots on oilseed rape leaves (5-9.8 cm) (Fitt *et al.*, 1992), it is concluded that the splash-dispersal process is mainly influenced by the host support characteristics, e.g. leaf surface roughness, age and waxiness. However, the distances reported in this study under controlled conditions for *L. maculans* were much shorter than those reported in field. Under field conditions distances of 105 cm (Barbetti, 1976) and 216 cm (Hall *et al.*, 1996) have been reported, underlining the importance of pycnidiospores splash-dispersal of pycnidiospores from plants grown from infected seeds in the latter case. These greater distances are possibly due to wind which enhance dispersal distances of spore-carrying droplets (Fitt *et al.*, 1989), to the succession of generations and to differences in raindrop sizes which may range from 0.5 to 5 mm (Ulbrich, 1983). Pycnidiospores dispersed by large raindrops travel greater distances than those dispersed by the small raindrops (Huber *et al.*, 1996; Geagea *et al.*, 2000). Therefore, a proportion of splash droplets produced by the impact of large natural raindrops may travel further than the distances observed here.

This study showed that oilseed rape stubble bearing pycnidia constitutes a potential source of inoculum. Since isolates of *L. maculans* are able to survive asexually in the field (Alabouvette & Brunin, 1970; Petrie, 1995; Baird *et al.*, 1999), pycnidia-bearing stubble is likely to contribute to the transmission of asexual inoculum (pycnidiospores) between



growing seasons. This could happen when oilseed rape is sown in a field where infected stubble from the previous season has remained at the soil surface, and where recommended crop rotations are not respected. The infected stubble could also be a source of inoculum for oilseed rape sown in an adjacent field. Nevertheless field experimentation is required to quantify its role in pluriannual epidemics; for example, exposing an oilseed rape crop to pycnidia-bearing stubble in a site with no ascospore infection.

The slopes of the disease dispersal and pycnidiospore dispersal gradients under experimental conditions did not significantly differ. Therefore, spatial disease dispersal matches spatial pycnidiospore dispersal. A splash droplet could be regarded as the smallest infectious element required for the reproduction of the disease, that is the infectious unit of dissemination (UD) (Rapilly, 1977; 1979). Hammond & Lewis (1987) showed that the infection efficiency of an 8  $\mu$ L drop containing four pycnidiospores varied between 5 and 10% according to the pathogen isolates and the cultivars used, whereas it varied between 10 and 60% when the drop contained 40 pycnidiospores. These concentrations are similar or even lower than those we observed in the splash droplets, whose estimated volume was mainly lower than 8  $\mu$ L and which most of the time contained more than four pycnidiospores. Blackleg spread in the field is expected to be very effective since spore carrying droplets results in dissemination of inoculum. This dissemination probably permits the appearance of clusters of secondary phoma leaf spots around an old lesion on the same leaf, or direct stem infection by pycnidiospores. In addition to splash-dispersal, pycnidiospores embedded in water films might be spread by leaf to leaf or leaf to stem contact.

The results reported in this paper support the hypothesis that pycnidiospores may be more significant than usually believed for the biology of *L. maculans* and the epidemiology of the blackleg disease in small populations. Pycnidiospores can potentially increase the size of the fungal population through secondary spread; this may increase the probability of mating between opposite mating types on the same plant, which would result in sexual reproduction and production of pseudothecia containing ascospores that are wind-dispersed on long distances. Alternatively, in the absence of sexual reproduction, pycnidiospore dispersal from stubble provides an alternative source of inoculum. Thus pycnidiospores could have a major role for low population densities, but field studies are required to quantify the relevance of pycnidiospores in different cropping systems.



## 5. Acknowledgements

This research is part of a PhD project funded jointly by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Region Bretagne. It was also supported in part by Comité Technique Permanent de la Sélection (CTPS). The authors are deeply grateful to J.P. Masson (Agrocampus Rennes) for help with statistical analyses, F. Rouault and S. Jumel (INRA) for technical help with the rain simulator, and M. Ermel and A.L. Besnard (INRA) for general technical support. We also thank R. Kutcher (AAFC) for its linguistic revision of the manuscript.

## 6. References

- Alabouvette C, Brunin B, 1970. Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. *Annales de Phytopathologie* **2**, 463-475.
- Asseline J, Valentin C, 1978. Construction et mise au point d'un infiltromètre à aspersion. *Cahiers ORSTOM* **XV**, 321-349.
- Baird RE, Phillips DV, Mullinix BG, Alt PJ, 1999. Relative longevity of *Leptosphaeria maculans* and associated mycobiota on canola debris. *Phytoprotection* **80**, 1-11.
- Barbetti MJ, 1976. The role of pycniospores of *Leptosphaeria maculans* in the spread of blackleg disease in rape. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **16**, 911-913.
- Boerema GH, 1976. The *Phoma* species studied in culture by Dr R. W. Dennis. *Transactions of the British Mycological Society* **67**, 289-319.
- Campbell CL, Madden LV, 1990. Introduction to Plant Disease Epidemiology. New York, John Wiley & Sons.
- Evans N, Baierl A, Steed JS, Huang YJ, Fitt BDL, 2004. Spatial aspects of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) epidemiology. *IOBC Bulletin* **27**, 139-144.
- Fatemi F, Fitt BDL, 1983. Dispersal of *Pseudocercospora herpotrichoides* and *Pyrenopeziza brassicae* spores in splash droplets. *Plant Pathology* **32**, 401-404.
- Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR, 2006. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 3-15.
- Fitt BDL, Gregory PH, Todd AD, McCartney HA, MacDonald OC, 1987. Spore dispersal and plant disease gradients ; a comparison between two empirical models. *Journal of Phytopathology* **118**, 227-242.



- Fitt BDL, Inman AJ, Lacey ME, McCartney HA, 1992. Splash dispersal of spores of *Pseudocercospora capsellae* (white leaf spot) from oilseed rape leaves of different inclination, flexibility and age. *Journal of Plant Diseases and Protection* **99**, 234-244.
- Fitt BDL, McCartney HA, Walklate PJ, 1989. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 241-270.
- Geagea L, Huber L, Sache I, 1999. Dry-dispersal and rain-splash of brown (*Puccinia recondita f.sp. tritici*) and yellow (*P. striiformis*) rust spores from infected wheat leaves exposed to simulated raindrops. *Plant Pathology* **48**, 472-482.
- Geagea L, Huber L, Sache I, Flura D, McCartney HA, Fitt BDL, 2000. Influence of simulated rain on dispersal of rust spores from infected wheat seedlings. *Agricultural and Forest Meteorology* **101**, 53-66.
- Gregory PH, 1968. Interpreting plant disease dispersal gradients. *Annual Review of Phytopathology* **6**, 189-212.
- Guo XW, Fernando WGD, 2005. Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria maculans* from canola stubble in relation to environmental conditions. *Plant Disease* **89**, 97-104.
- Hall R, 1992. Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 46-55.
- Hall R, Chigogora JL, Phillips LG, 1996. Role of seedborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* in development of blackleg on oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **18**, 35-42.
- Hammond KE, Lewis BG, 1987. The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **36**, 135-147.
- Horberg HM, 2002. Patterns of splash dispersed conidia of *Fusarium poae* and *Fusarium culmorum*. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 73-80.
- Howlett BJ, 2004. Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **26**, 245-252.
- Howlett BJ, Idnorum A, Pedras MSC, 2001. *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of Brassicas. *Fungal Genetics and Biology* **33**, 1-14.
- Huber L, Fitt BDL, McCartney HA, 1996. The incorporation of pathogen spores into rain-splash droplets: a modelling approach. *Plant Pathology* **45**, 506-517.
- Jenkinson P, Parry DW, 1994. Splash Dispersal of Conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. *Mycological Research* **98**, 506-510.
- Kiyosawa S, 1972. Mathematical studies on the curve of disease increase - A technique for forecasting epidemic development. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **38**, 30-40.





- Li H, Tapper N, Dean N, Barbetti MJ, Sivasithamparam K, 2006. Enhanced pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores from paired co-inoculation of *Brassica napus* cotyledons with ascospores. *Annals of Botany* **97**, 1151-1156.
- Li. H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ, Kuo J, 2004. Germination and invasion by ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* on spring-type *Brassica napus* canola varieties with varying susceptibility to blackleg. *Journal of General Plant Pathology* **70**, 261-269.
- Madden LV, 1992. Rainfall and the dispersal of fungal spores. *Advances in Plant Pathology* **8**, 39-79.
- McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 349-379.
- McGee DC, 1977. Black leg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) of rapeseed in Victoria : sources of infection and relationships between inoculum, environmental factors and disease severity. *Australian Journal of Agricultural Research* **28**, 53-62.
- Pedersen EA, Morrall RAA, McCartney HA, Fitt BDL, 1994. Dispersal of conidia of *Ascochyta fabae* f. sp. *lentis* from infected lentil plants by simulated wind and rain. *Plant Pathology* **43**, 50-55.
- Petrie GA, 1995. Long-term survival and sporulation of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) on naturally-infected rapeseed/canola stubble in Saskatchewan. *Canadian Plant Disease Survey* **75**, 23-34.
- Rapilly F, 1977. Réflexions sur les notions de propagule et d'unité de dissémination en épidémiologie végétale: cas des champignons parasites des organes aériens des plantes. *Annales de Phytopathologie* **9**, 161-176.
- Rapilly F, 1979. Yellow rust epidemiology. *Annual Review of Phytopathology* **17**, 59-73.
- Rapilly F, 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale, mycoses aériennes. Paris, INRA.
- Salisbury PA, Ballinger DJ, Wratten N, Plummer KM, Howlett BJ, 1995. Blackleg disease on oilseed Brassica in Australia: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **35**, 665-672.
- Smith HC, Sutton BC, 1964. *Leptosphaeria maculans* the ascogenous state of *Phoma lingam*. *Transactions of the British Mycological Society* **47**, 159-165.
- Ulbrich CW, 1983. Natural variations in the analytical form of the raindrop size distribution. *Journal of Climate Applied Meteorology* **22**, 1764-1775.
- West JS, Biddulph JE, Fitt BDL, Gladders P, 1999. Epidemiology of *Leptosphaeria maculans* in relation to forecasting stem canker severity on winter oilseed rape in the UK. *Annals of Applied Biology* **135**, 535-546.



- West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL, 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**, 10-27.
- Williams PH, 1992. Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 30-35.
- Wood PMR, Barbetti MJ, 1977. A study on the inoculation of rape seedlings with ascospores and pycnidiospores of the blackleg disease causal agent *Leptosphaeria maculans*. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* **4**, 79-80.
- Xi K, Morrall RAA, Gugel RK, Verma PR, 1991. Latent infection in relation to the epidemiology of blackleg of spring rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* **13**, 321-331.



## **PROGRESSION SYSTEMIQUE DE *LEPTOSPHAERIA MACULANS* JUSQU'AU COLLET DE LA PLANTE DE COLZA, SITE DE LA REPRODUCTION SEXUEE**

*Les résultats rapportés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication acceptée en mai 2008 dans le journal « Plant Pathology » (Article 2) :*

Travadon R, Marquer B, Ribulé A, Sache I, Brun H, Delourme R, Bousset L, 2008. Systemic progress of *Leptosphaeria maculans* from cotyledons to hypocotyle in oilseed rape: influence of the number of infection sites, of intraspecific competition and of host polygenic resistance. *Plant Pathology* (accepté)

*Ce chapitre a également servi de référence à la rédaction d'une synthèse bibliographique sur la progression systémique de *L. maculans* au sein de la plante de colza qui sera publiée en 2008 par le CETIOM dans un ouvrage intitulé « Le point sur le Phoma » (Annexe 2).*

### **1. Problématique**

Nous étudierons dans ce chapitre un caractère propre à notre pathosystème, la progression systémique de *Leptosphaeria maculans* au sein de la plante de colza. En effet, ce champignon présente dans son cycle épidémique une étape de colonisation systémique et biotrophe des tissus de son hôte qui lui permet d'atteindre la tige de la plante de colza à partir d'infections cotylédonaire et foliaires (Hammond & Lewis, 1986). La tige du colza est le site des dommages les plus préjudiciables à la culture du colza, la nécrose du collet qui peut provoquer la verse de la plante dans les cas les plus sévères ou bien détériorer l'alimentation de la plante et donc sa production de graines ; la tige du colza est également le lieu de rencontre entre souches de types sexuels compatibles (Schmit *et al.* 2002) et ainsi le site de production de pseudothèces suite à la reproduction sexuée.

Dans le chapitre précédent, nous avons conclu que la dispersion par la pluie des pycnidiospores de *L. maculans* pouvait faciliter la rencontre sur une même plante de partenaires pour la reproduction sexuée. Certes ce mécanisme pourrait augmenter le succès reproducteur dans les populations de faible densité en minimisant la difficulté de rencontre entre individus distants, mais l'accès au site de la reproduction sexuée est ensuite conditionné par le cheminement systémique de deux individus de types sexuels compatibles jusque dans la tige d'une même plante de colza.

Dans ce chapitre, à partir de travaux conduits en conditions contrôlées, nous nous intéresserons particulièrement à trois facteurs, intrinsèques au pathosystème, qui pourraient moduler la réussite de la progression systémique de *L. maculans* :



**Figure 3.1** : Jeunes plantes de colza inoculées sur cotylédons avec des gouttes de 10  $\mu$ L de suspensions de pycnidiospores.

- La présence du champignon dans la tige du colza dépend-elle du nombre de points d'infections sur cotylédons ?
- Existe-t-il des effets compétitifs entre souches du champignon durant cette phase de colonisation systémique ?
- Comment une résistance polygénique du colza influence-t-elle la probabilité du champignon d'atteindre la tige du colza ?

Les méthodes employées dans ce chapitre nous permettront aussi d'évaluer les effets du nombre de sites infectieux sur cotylédons et de la résistance polygénique du colza sur la sévérité des nécroses du collet.

## **2. Matériel et Méthodes** (pour une description détaillée se référer à l'article 2)

### **2.1 Matériel végétal et inoculation**

Deux lignées haploïdes doublées de colza ont été utilisées dans les expérimentations. Ces deux lignées de colza sont issues du croisement entre les variétés 'Darmor-*bzh*' et 'Yudal' (Pilet *et al.*, 1998). La première lignée, A30, est sensible à la maladie. La seconde, C119, présente un fort niveau de résistance polygénique au champ à la maladie, ce qui se traduit par une incidence et une sévérité moindres que sur variétés sensibles.

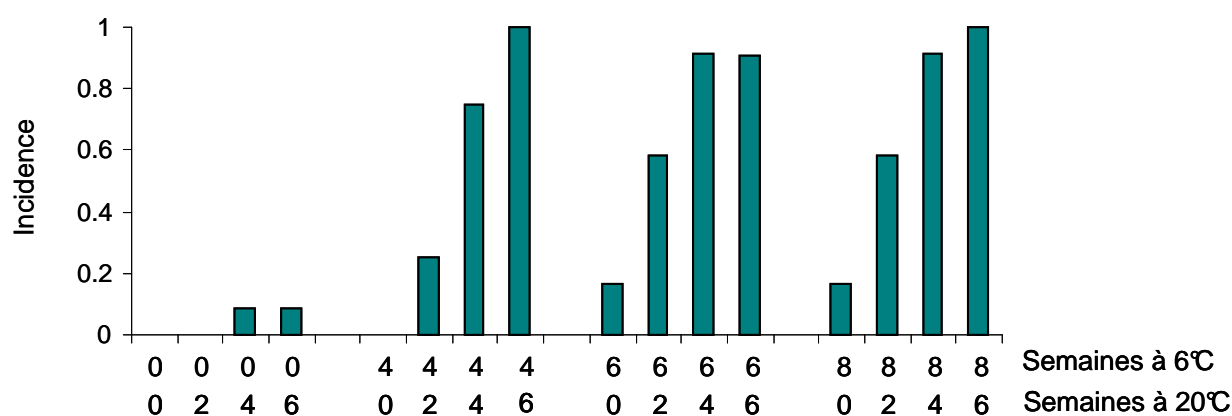
L'inoculum utilisé dans les expérimentations était constitué de suspensions de pycnidiospores à une concentration de  $10^7$  spores par mL, obtenues pour deux souches de *L. maculans* nommés A290v et P27d.

Les inoculations ont été réalisées en déposant une ou plusieurs gouttes, de volume 10  $\mu$ L, de solutions de pycnidiospores sur cotylédons blessés (Figure 3.1). Différents nombres de gouttes (c'est-à-dire de sites infectieux) ont été testés, ainsi que le dépôt de gouttes des deux souches à des sites différents sur une même plante pour les expérimentations visant à étudier la compétition entre souches.

### **2.2 Notation des nécroses au collet et détection du champignon**

Pour chaque type d'expérimentation l'incidence (présence / absence) et la sévérité (longueurs de nécroses externe, interne et note de nécrose en coupe transversale) de la maladie ont été mesurées au niveau de l'hypocotyle.





**Figure 3.2** : Incidence des nécroses au collet en fonction de la séquence de températures (semaines à 6 °C suivies de semaines à 20 °C) à laquelle sont exposées les plantes à partir de 21 jours après inoculation sur cotylédons.

**Tableau 3.1** : Incidence et sévérité (longueur moyenne de nécrose externe, note moyenne de nécrose et erreur standard (se)) des nécroses au collet pour les deux lignées de colza (A30 sensible et C119 résistante) dans chacune des trois expériences.

	lignée	Exp1	Exp2	Exp3
Incidence (%)	A30	24.28	74.65	55.56
	C119	8.57	16.67	32.56
Longueur moyenne de nécrose externe (mm) (se)	A30	2.90 (6.71)	20.31 (21.46)	11.96 (19.25)
	C119	0.66 (2.94)	2.09 (5.86)	0.99 (4.55)
Note moyenne de nécrose (se)	A30	1.43 (1.09)	3.16 (2.20)	2.57 (2.21)
	C119	1.14 (0.63)	1.31 (0.92)	1.32 (0.69)

Pour les plantes co-inoculées avec les deux souches, la détection des deux souches du champignon a été réalisée par amplification par PCR de trois marqueurs moléculaires minisatellites à partir des ADN génomiques fongiques extraits des hypocotyles, les deux souches étant polymorphes pour chacun de ces trois marqueurs.

### 3. Résultats

#### ***3.1 Mise au point d'une méthode en conditions contrôlées permettant l'expression de nécrose au collet à partir d'inoculation sur cotylédons***

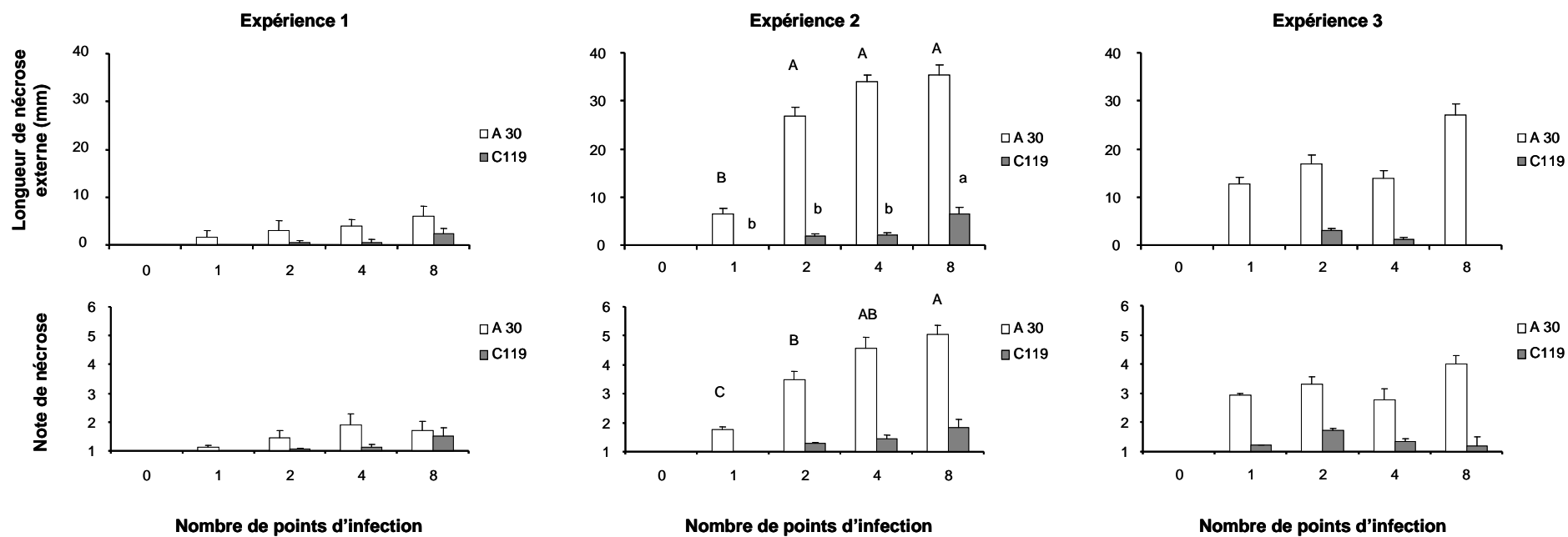
A partir de 21 jours après inoculation, la culture des plantes à de basse température (6 °C) a permis d'augmenter sensiblement l'incidence des nécroses au collet. Les plantes inoculées n'ayant pas été exposées ultérieurement à 6 °C n'ont été que très peu atteintes par la maladie (Figure 3.2). Quelle que soit la durée d'exposition des plantes à 6 °C (4, 6 ou 8 semaines), l'augmentation de la durée ultérieure de culture des plantes à 20 °C a résulté en un accroissement de l'incidence des nécroses au collet (Figure 3.2). Pour s'assurer un taux d'infection élevé tout en minimisant la durée totale d'expérimentation, la séquence choisie pour les expérimentations est de 4 semaines à 6 °C suivie de 6 semaines à 20 °C.

#### ***3.2 Influence du nombre de points d'infection sur cotylédons et de la résistance polygénique sur l'incidence et la sévérité des nécroses au collet***

Trois expériences, décalées d'une semaine dans le temps, ont permis de tester 5 nombres de points d'infection sur cotylédons (0, 1, 2, 4 ou 8 gouttes par plante) sur les deux lignées de colza (A30 et C119).

L'incidence des nécroses au collet a augmenté avec le nombre de points d'infection sur cotylédons. Par exemple pour l'expérience 2 et la lignée de colza sensible A30, les incidences étaient de 0 %, 44 %, 66 %, 94 % et 94 % pour les doses d'inoculum 0, 1, 2, 4 et 8 gouttes respectivement, en remarquant ici des incidences égales entre les doses 4 et 8 gouttes sur cotylédons. De la même manière la sévérité des nécroses au collet a augmenté avec le nombre de points d'infection sur cotylédons (Figure 3.3).

Sur la lignée C119 présentant une résistance polygénique, à la fois l'incidence et la sévérité des nécroses au collet ont été significativement plus faibles que sur la lignée sensible A30 (Tableau 3.1 ; Figure 3.3). Par exemple dans l'expérience 2, les incidences étaient de 75 %



**Figure 3.3 :** Influence du nombre de points d'infection sur cotylédon sur la sévérité des nécroses au collet (longueur de nécrose externe et note de nécrose) pour les deux lignées de colza (A30 sensible et C119 résistant).

et de 17 % et les longueurs moyennes de nécrose externe de 20 mm et de 2 mm sur les lignées sensible et résistante respectivement.

### **3.3 Compétition entre souches durant la progression systémique du champignon**

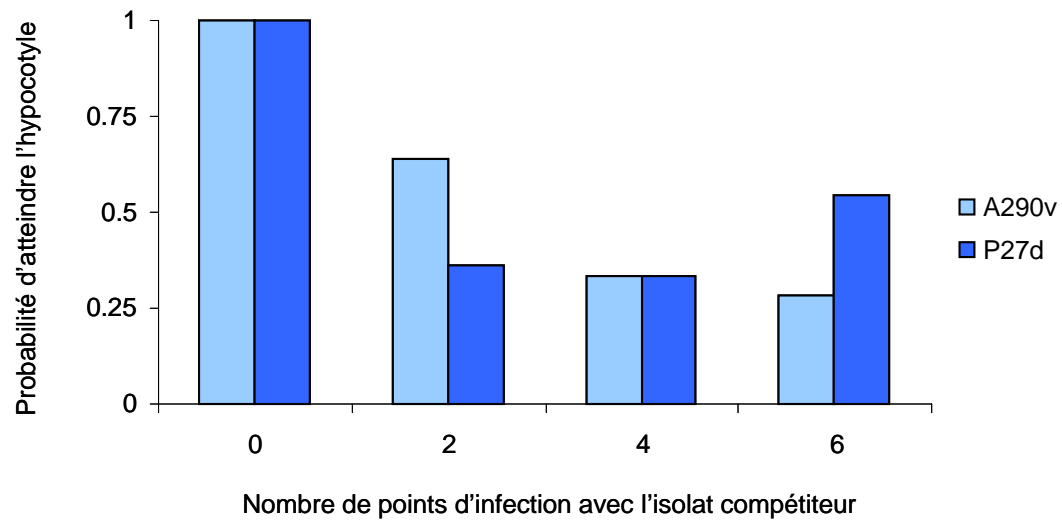
En co-inoculant les deux souches A290v et P27d sur les cotylédons d'une même plante et en favorisant la progression systémique du champignon des cotylédons jusqu'à l'expression de nécroses au collet, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'effets compétitifs entre ces deux souches. Chaque souche a été testée soit en tant que souche « testée » (inoculé à raison de 2 gouttes par plante) soit en tant que souche compétitrice (co-inoculée avec la souche « testée » à raison de 0 [eau], 2, 4 ou 6 gouttes par plante).

Pour les plantes présentant une nécrose visible à l'œil nu au niveau de l'hypocotyle, la souche « testée » a systématiquement été détectée dans l'hypocotyle lorsque la souche « compétitrice » n'était pas inoculée sur cotylédons (souche « testée » co-inoculée avec de l'eau). Pour la souche A290v « testée », sa probabilité d'atteindre l'hypocotyle a diminué avec l'augmentation du nombre de sites infectieux sur cotylédons de la souche P27d « compétitrice » (Figure 3.4). Pour la souche P27d « testée », sa probabilité d'atteindre l'hypocotyle a également diminué avec le nombre croissant de sites infectieux de la souche A290v « compétitrice » ; cependant, cette probabilité s'est avérée supérieure pour la dose de compétiteur « 6 gouttes » par rapport aux doses « 2 et 4 gouttes ». Ce résultat s'explique en partie par le fait que la souche P27d « testée » a fréquemment été détectée avec la souche A290v « compétitrice » lorsque celle-ci était inoculée à raison de 6 gouttes par plante (Figure 3.4), mais pourrait aussi révéler des différences d'aptitude à atteindre l'hypocotyle par voie systémique à partir des cotylédons entre les deux souches.

Pour les plantes testées sans nécroses visibles à l'œil nu, la détection du champignon s'est révélée positive dans 23 % des cas (14 cas sur 59). Nous avons ainsi détecté la présence du champignon à l'intérieur de plantes sans symptômes visibles, confirmant des observations antérieures (Xi *et al.*, 1991).

## **4. Conclusions – Discussion**

La méthode employée dans cette étude incluant l'exposition des plantes inoculées à de basses températures nous a permis d'augmenter l'expression des nécroses au collet à partir d'inoculations sur cotylédons. Cette méthode reproduit les conditions de culture au champ du colza d'hiver en France, semé à l'automne en conditions tempérées, présentant



**Figure 3.4** : Probabilité de colonisation de l'hypocotyle pour chaque souche (A290v et P27d) en fonction du nombre de points infectés par plante sensible avec la souche compétitrice.

une phase d'arrêt de croissance pendant l'hiver lors des températures froides, puis reprenant sa croissance au printemps.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'incidence des nécroses au collet, et donc la présence du champignon dans la tige du colza, dépendait à la fois du nombre de sites infectieux sur cotylédons et de la résistance polygénique de l'hôte. Nos résultats laissent penser qu'à faible densité de population du champignon, l'augmentation du nombre de macules sur une même plante par cycles secondaires faciliterait la progression du champignon jusqu'à la tige, site de la reproduction sexuée.

Nos résultats suggèrent également que la réussite de colonisation de la tige pour un individu pourrait dépendre de la présence d'autres individus sur feuilles ou cotylédons, et notamment de la densité relative de chacun des individus. Des effets compétitifs semblent en effet intervenir au cours de la colonisation systémique des tissus de l'hôte, avec la probabilité pour un individu d'atteindre la tige qui diminuerait avec le nombre croissant de sites infectieux d'un individu compétiteur. Contre-intuitivement, la présence sur une même plante d'individus virulents du même type sexuel pourrait ainsi défavoriser l'accès au site de la reproduction pour un individu du type sexuel compatible et minoritaire sur feuilles ou cotylédons. L'absence de reproduction sexuée due au déséquilibre entre les types sexuels dans une même tige, parfois observée au champ (Schmit *et al.* 2002), empêcherait la formation et la dispersion à longue distance d'ascospores virulentes, limitant ainsi l'adaptation du champignon à la résistance spécifique correspondante.

Aussi la combinaison d'une résistance polygénique avec une résistance spécifique nouvelle limiterait l'accès au site de la reproduction sexuée par voie systémique pour les individus virulents, et limiterait ainsi les capacités de reproduction sexuée de ces individus virulents. Sachant que les ascospores de *L. maculans* constituent son moyen le plus efficace de transmettre des descendants virulents entre saisons culturales car les ascospores sont dispersées sur de longues distances par le vent et capables de rencontrer un hôte distant, l'utilisation de variétés associant à la fois résistance monogénique et polygénique semble un moyen approprié pour restreindre la production d'ascospores virulentes. Il reste néanmoins à confirmer que cette construction variétale réduit bien les effectifs efficaces du champignon. Une expérimentation au champ étudiant la transmission interannuelle de descendants sur des parcelles emblavées avec deux variétés différant par la présence d'une résistance polygénique semble soutenir cette hypothèse (Lydia Bousset, communication personnelle). Ces combinaisons des deux types de résistance dans une même variété augmentent



l'efficacité dans le temps d'une résistance monogénique en limitant l'adaptation du champignon (Brun *et al.*, 2000 ; 2007).

## 5. Perspectives

D'une part cette méthode en conditions contrôlées laisse entrevoir des applications pour l'étude et la discrimination de différents niveaux de résistance polygénique chez le colza, et pour évaluer et discriminer les niveaux d'agressivité (exprimée en vitesse de colonisation de la tige et en sévérité des nécroses occasionnées) des souches de *L. maculans*. Toutefois, le matériel végétal et fongique utilisé dans notre étude (deux lignées de colza et deux isolats) ne permet pas de conclure quant à la possible utilisation de ce test à ces fins. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour éventuellement étendre les applications de la méthode proposée.

D'autre part les résultats obtenus dans cette étude requièrent d'être confirmés en conditions de plein champ où la relation entre nombre de macules sur feuilles et sévérité des nécroses au collet n'a pas toujours été clairement démontrée (pour revue voir West *et al.*, 1999). En revanche la diminution de la sévérité des nécroses du collet au champ sur lignée ou variété de colza avec résistance polygénique a déjà été montrée (Delourme *et al.*, 2006), mais entre ces variétés résistantes et des variétés sensibles des différences de production de pseudothèces sur les résidus de tige n'ont pas été observées pour des sévérités de nécrose au collet identiques (Lô-Pelzer *et al.*, 2008). La réduction de la production de pseudothèces n'est pas mise en évidence entre plantes différant pour une résistance quantitative mais devrait l'être à l'échelle d'une parcelle.

Concernant les effets compétitifs entre souches au cours de la progression systémique, des expérimentations utilisant des souches exprimant des protéines fluorescentes (Huang *et al.*, 2007) permettraient de déterminer de manière non destructive à la fois si ces effets compétitifs se traduisent par une exclusion spatiale entre hyphes mycéliens ou par une compétition trophique entre souches, et à quel niveau (limbe, pétiole ou tige) une souche exerce un effet négatif sur l'autre.





## Systemic growth of *Leptosphaeria maculans* from cotyledons to hypocotyl in oilseed rape: influence of the number of infection sites, of intraspecific competition and of host polygenic resistance

R. Travadon <sup>a\*</sup>, B. Marquer <sup>a</sup>, A. Ribulé <sup>a</sup>, I. Sache <sup>b</sup>, H. Brun <sup>a</sup>, R. Delourme <sup>c</sup>, L. Bousset <sup>a</sup>

<sup>a</sup> INRA, Agrocampus Rennes, Univ. Rennes 1, UMR1099 BiO3P (Biology of Organisms and Populations applied to Plant Protection), F-35653 Le Rheu

<sup>b</sup> INRA, AgroParisTech UMR1290 BIOGER - CPP, 78850 Thiverval Grignon, France

<sup>c</sup> INRA, Agrocampus Rennes, Univ. Rennes 1, UMR118 APBV (Plant Genetics and Biotechnologies), F-35653 Le Rheu

### Abstract

Influence of competitive effects between two isolates, of the number of infection sites on cotyledons and of host polygenic resistance on the systemic growth of *Leptosphaeria maculans*, which causes phoma stem canker of oilseed rape, were investigated. From oilseed rape leaf infection, systemic and biotrophic colonisation of plant tissues allows the fungus to reach the stem, the site of mating between compatible isolates. Experiments were conducted in controlled conditions. Two oilseed rape double haploid lines, one susceptible and the other with a high level of polygenic resistance, were inoculated on wounded cotyledons with pycnidiospore suspensions obtained from two isolates. Presence of the two isolates in stem was detected with molecular markers. Expression of cankers in plant was enhanced by exposing inoculated plants to low temperatures (6°C). The fungus was detected in all stems with canker symptoms visible to the naked eye and also in the stem of 14 out of the 59 plants without visible cankers on the hypocotyls. Disease severity increased with the number of infection sites on cotyledons. Probability for one isolate to reach hypocotyl from inoculated cotyledons decreased with the increasing competing inoculum load on cotyledons. Polygenic resistance significantly reduced disease incidence and severity. Intraspecific interactions during systemic growth of *L. maculans*, as described in this paper, are a critical mechanism for the success of sexual reproduction. It opens up new possibilities to assess levels of polygenic resistance to stem canker in *B. napus* and to study aggressiveness of *L. maculans* isolates.

**Keywords:** *Phoma lingam*, *Brassica napus*, phoma stem canker, competitive effects



## 1. Introduction

Phoma stem canker (blackleg) is a worldwide disease of *Brassica* crops. It is the most damaging disease of *Brassica napus*, both on winter and spring cultivars. This disease is of major economic importance in Europe, North America and Australia (West *et al.*, 2001; Fitt *et al.*, 2006). In France, where oilseed rape is mainly grown as a winter crop, yield decrease due to lodging can reach 20% (Pinochet *et al.*, 2003). In the UK, losses were estimated to €56M per season in 2000-2002 ([www.cropmonitor.co.uk](http://www.cropmonitor.co.uk)). In Western Australia, for growing seasons 1998 and 1999, losses were estimated to €18.6M and €49.4M, respectively (Khangura & Barbetti, 2001).

Damaging phoma stem canker is caused by the heterothallic dothideomycete fungus *Leptosphaeria maculans* (anamorph *Phoma lingam*). Epidemics are generally initiated by airborne ascospores released from pseudothecia formed on infected oilseed rape stubble remaining from the previous growing season (Hall, 1992). The period of ascospore release can last out several months and coincides with the presence of young and susceptible plants (West *et al.*, 2001) whose occurrence varies among regions and countries. Ascospores first adhere to cotyledons and leaves of new seedlings and then germinate in humid conditions to produce hyphae that cause infection via stomatal pores or wounds. After the incubation period, leaf lesions called phoma leaf spots appear. Phoma leaf spots are circular pale green spots, 1-2 cm in diameter, carrying pycnidia that produce pycnidiospores involved in the secondary spread of disease (Barbetti, 1976; Travadon *et al.*, 2007). Following initial infection of the leaf, mycelial hyphae colonise the lamina mesophyll, then grow down the petiole and the stem through xylem vessels or between cells of the xylem parenchyma and cortex in a biotrophic, systemic and visually symptomless way, and finally cause stem cankers (Hammond *et al.*, 1985).

Management of phoma stem canker primarily relies on the cultivation of resistant material (Aubertot *et al.*, 2006b). Resistance to *L. maculans* in *B. napus* lines and varieties is of two kinds. First, race-specific resistance is effective at both the seedling and adult plant stages. Controlled by major genes, this type of resistance is based on the gene-for-gene interaction between avirulence genes in *L. maculans* (*AvrLm*) and the matching resistance genes in *B. napus* (*Rlm*) (Ansan-Melayah *et al.*, 1995; 1998). Second, quantitative and, to date, not race-specific, resistance is polygenic (mediated by Quantitative Trait Loci) and expressed at the adult plant stage. Quantitative resistance in *B. napus* does not decrease either leaf or cotyledon infection but varieties with such a resistance develop less severe disease before harvest than cultivars without it (Delourme *et al.*, 2006).



Two major resistance genes (*Rlm*) have been overcome in France (*Rlm1* introduced into several winter cultivars) and Australia (resistance from *Brassica rapa* var. *sylvestris* introduced into cv. Surpass 400) within three years of their commercial deployment (Li & Sivasithamparam, 2003; Rouxel *et al.*, 2003; Sprague *et al.*, 2006). Loss of effectiveness of a major resistance gene corresponds to a rapid increase in the frequency of the matching virulence in pathogen populations, which illustrates the high evolutionary potential of *L. maculans*. The adaptation of pathogen populations first requires the apparition of virulent isolates and second the transmission of virulence to offspring so that this trait can become a selective advantage. Virulent individuals appear by mutation and/or recombination at very low frequency in the pathogen population. There are two ways of transmission of offspring in *L. maculans* populations, either through asexual multiplication or sexual reproduction. Mycelium survives asexually on oilseed rape stem debris (stubble) during intercropping and finally produces pycnidia (Petrie & Lewis, 1985; Baird *et al.*, 1999), from which pycnidiospores can be rain-splashed to new resistant crop grown in the same field. Splash-dispersed pycnidiospores of *L. maculans* travel short distances (Travadon *et al.*, 2007). In this case, virulence transmission requires the cultivation of oilseed rape in the same field as stubble from previous oilseed rape crops. Alternatively, sexual reproduction results in pseudothecia formation and ascospore production. Wind-dispersed over several kilometres (McGee, 1977), ascospores may encounter their resistant host grown in distant fields.

A prerequisite to sexual reproduction is the mating of compatible isolates in the same oilseed rape stem. Direct colonisation of wounded stem was postulated from a field study (Xi *et al.*, 1991). More generally, systemic growth of *L. maculans* from infected leaf or cotyledon to the stem is a mandatory step before sexual reproduction, and is thus an essential key for a large scale adaptation of pathogen populations to major resistance genes in *B. napus*. This systemic and biotrophic stage could act as a filter for *L. maculans* individuals present on leaves and cotyledons if only part of them succeed in stem colonisation. Stem colonisation success might be modulated by leaf infection densities and by the host polygenic resistance. Competition between *L. maculans* isolates, defined as the negative effects that one organism has upon another by consuming, or controlling access to, a resource that is limited in availability (Keddy, 1989), could alter the capacity of a given isolate to reach the stem and further to mate sexually. Among coexisting organisms, the effects of competition on reproductive output increase with increasing population density (Arthur, 1987); thus the fitness of each strain, *i.e.* the per-individual contribution to next generation gene pool (Roughgarden, 1979), will depend on the absolute densities of all strains in mixed populations (Newton *et al.*, 1997). Therefore, the dynamic of systemic growth might be an essential component of the relative-fitness of *L. maculans* individuals.



Previous studies on the systemic pathway of *L. maculans* were conducted in the field (Hammond & Lewis, 1986; Xi *et al.*, 1991; Schmit *et al.*, 2002) while experiments in controlled conditions have focused on the mycelial growth in the leaf lamina (Hammond & Lewis, 1987), or from the leaf lamina to the petiole (Hammond *et al.*, 1985; Xi *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 2007), using petiole inoculation (Newman, 1984; Kutcher *et al.*, 1993) or direct stem inoculation (Nathaniels & Taylor, 1983). The published methods allowing the development of stem canker after cotyledon inoculation (Bansal *et al.*, 1994; Johnson & Lewis, 1994) did not give satisfying results when tested in our conditions. A prerequisite for our study was therefore to set up and validate a reliable inoculation method in controlled conditions. Using that method, the purpose of the present work was (i) to evaluate the effect of the number of infection sites on cotyledon on stem canker incidence and severity, (ii) to assess the effect of polygenic resistance on the systemic growth of the fungus, and (iii) to assess the probability of stem colonisation by one isolate inoculated on cotyledon or co-inoculated with an increasing load of a competing isolate.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Inoculum and plant material

Two isolates of *L. maculans*, A290v (Mat1-2, *AvrLm1*, *avrLm2*, *avrLm3*, *avrLm4*, *AvrLm5*, *AvrLm6*, *AvrLm7*, *AvrLm8*, *avrLm9*, *AvrLm10*) (Somda *et al.*, 1999) and P27d (Mat1-2, *AvrLm1*, *avrLm2*, *avrLm3*, *avrLm4*, *AvrLm5*, *AvrLm6*, *AvrLm7*, *avrLm9*, *AvrLm10*), were obtained from single ascospores isolated from diseased *B. napus* stubble collected in Le Rheu (France) according to the method described by Smith & Sutton (1964). Inoculum, consisting of suspensions of  $10^7$  pycnidiospores per mL, was obtained as described by De March *et al.* (1986). Experiments were conducted with two double haploid lines of *B. napus* derived from the cross 'Darmor-bzh' × 'Yudal' (Pilet *et al.*, 1998). The first line, A30, was highly susceptible to stem canker, whereas adult plants from the second line, C119, had a high level of field polygenic resistance to stem canker

### 2.2 Set up of a reliable method of plant growth and inoculation

After pregermination, 192 seeds of the susceptible line A30 were transplanted in propagation plugs Fertiss® (1:1:1 blond sphagnum peat/perlite/vermiculite) in 4 × 6 cm plug size. Seedlings were grown in a glasshouse at 20°C under a 16-h photoperiod for 10 days. Then the cotyledons were slightly wounded in the center of each lobe with a needle, and a 10-μL drop of a pycnidiospore suspension ( $10^7$  pycnidiospores per mL) was deposited on each wound. Plants treated with distilled water instead of spore suspension served as controls. A plastic cover was placed over the inoculated plants to create a 100% relative humidity (RH)





atmosphere. The inoculated plants were incubated in the dark at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  for 72 h in a growth chamber and then placed in an atmosphere with 70% RH (without plastic cover) with a 16-h photoperiod. Cotyledon senescence was delayed by leaving only the last appeared young leaf and removing the others during 14 days after inoculation. Infection efficiency was assessed 14 days and 21 days after inoculation by checking phoma leaf spot appearance. Twenty-one days after inoculation, the 192 plants were split in 4 groups of 48 plants. These groups were placed in a growth chamber at  $6 \pm 1^\circ\text{C}$  (low temperature) with a 16-h photoperiod and 60% RH for either 0, 4, 6 or 8 weeks. Afterwards, plants were placed in a growth chamber at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  with a 16-h photoperiod and 60% RH. Each of the four groups of 48 plants was then split in 4 sub-groups of 12 plants grown for either 0, 2, 4 or 6 weeks before each plant was visually checked for external stem cankers. Disease incidence was computed as the proportion of plants with external stem cankers for the 16 different cultural conditions.

### **2.3 Effect of the number of infection sites on cotyledon and of host polygenic resistance on incidence and severity of stem cankers**

Plants were inoculated and placed in growth conditions conducive to stem canker development selected from the experiment described above. In each of three repeated experiments, 1 to 8 infections sites per plant were inoculated with a single drop of A290v pycnidiospore suspension. Eighteen plants of each of the A30 susceptible line and C119 polygenic resistant line were tested for each inoculum load per experiment. Control plants (inoculum load “0”) were inoculated with distilled water. For inoculum loads “1”, “2” (one drop per cotyledon) and “4” (two drops per cotyledon) infection sites were in the centre of cotyledon lobes. For inoculum load “8”, there were two infection sites per cotyledon lobe, one near the basis of the half-lamina with respect to the petiole insertion (“low position”), the other 1 cm higher (“high position”). Stem canker was assessed by visual observations of external and internal longitudinal sections of hypocotyl, computing disease incidence as the proportion of plants with external stem cankers. Disease severity was assessed as both the length of external stem cankers and the score of internal stem cankers in a cross section on a 1-6 scale (1, healthy plant, no visible lesions; 2, 0-25% of discoloured cross-section; 3, 25-50% of discoloured cross-section; 4, 50-75% of discoloured cross-section; 5, 75-100% of discoloured section; 6, section without any living tissue) (Aubertot *et al.*, 2006a).

### **2.4 Intraspecific competition**

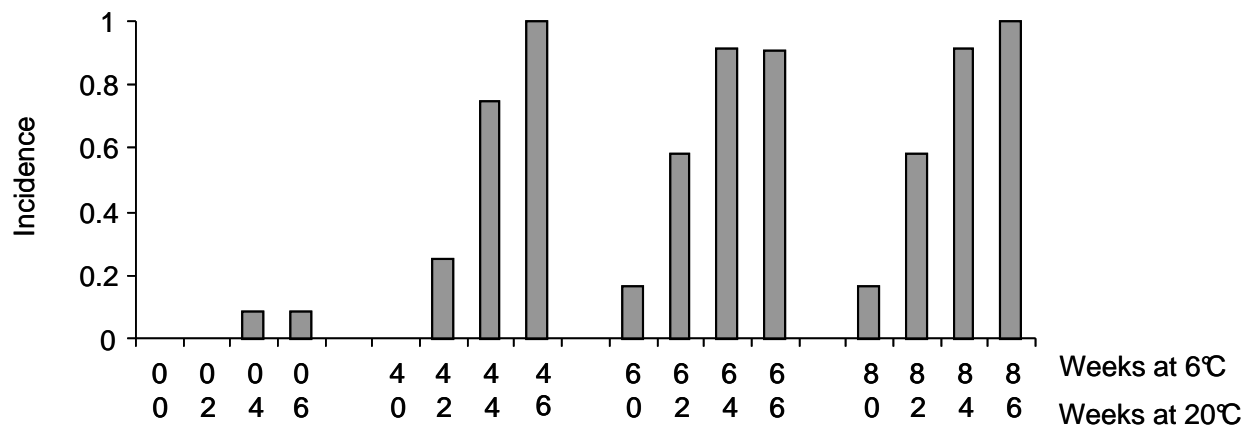
Pycnidiospore suspensions of isolates A290v and P27d were inoculated on cotyledons of the susceptible line A30 as described above. Three replicated experiments consisted each of nine treatments (four ratios for each of the two isolates plus one control inoculated with



distilled water) with 12 plants per treatment. The four inoculation ratios were 2 inoculum drops of one isolate (the tested isolate) either co-inoculated with 2 drops of water or co-inoculated with 2, 4 or 6 drops of the second isolate (the competing isolate). When more than four drops were inoculated per plant (inoculation ratios 2/4 and 2/6), we took account of each isolate inoculation position on cotyledon (“low position” and “high position” as previously described) to assess its effect on hypocotyl colonisation success. For fungal detection in the hypocotyl, a sample of 115 plants from the three experiments was tested, made of 56 plants that had internal or external stem cankers and 59 plants that were visually symptomless. From each plant, 3 hypocotyl samples of about 2 × 5 mm were cut off with a sterile scalpel from the stem cortex to the stem pith. The first sample was cut from the hypocotyl basis, the second from the middle of the hypocotyl and the third right underneath the cotyledon insertion point. Genomic DNA was extracted following the standard protocol supplied in the Nucleospin® Plant II kit (Macherey-Nagel) from a mix of the three hypocotyl samples. Presence of *L. maculans* in samples was detected by PCR amplifications of 3 minisatellite markers *MinLm2* (accession number AJ621801), *MinLm6* (accession number AJ621805) and *MinLm9* (M.H. Balesdent, personal communication), each marker being polymorphic between the A290v and P27d isolates. PCR reactions were performed in a 20-µl final volume containing 10-30 ng of genomic DNA, 1X PCR buffer, 200 µM of each dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, each primer at 0.5 µM, 0.25 U GoTaq® DNA Polymerase (Promega, WI, USA). Amplifications were carried out in a G-STORM GS4 thermocycler (GRI Ltd., Braintree, UK) using one cycle of 94°C for 4 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and 5 min of final extension at 72°C. Amplified DNA products were separated by electrophoresis of 5-µL aliquots of PCR mixtures on 2.5% agarose gels in 1X TBE buffer and visualised following SYBRSafe™ treatment (Invitrogen) and UV illumination. We checked the sensibility of PCR reactions to the amount of each isolate genomic DNA in the PCR mixture. For the three minisatellite markers tested, genomic DNA from both isolates was always amplified when proportions in the PCR mixture varied from 1 ng of one isolate with 25 ng of the other isolate to 15 ng of each isolate.

## 2.5 Statistical analysis

Disease incidence and severity data were analysed by linear models using the GLM procedure of SAS (SAS, 2000). A linear model was used to analyse the effect of the experiment, of the number of infection sites, of the line and of their interactions on disease severity (external necrosis length and necrosis score). Multiple comparisons between all pairs of means were performed by the Student-Newman-Keuls method. Linear regression and covariance analysis between internal necrosis length and the other dependent variables were performed with SAS.



**Figure 3.5:** Effect of temperature sequence (number of weeks at 6°C followed by number of weeks at 20°C) starting twenty-one days after inoculation on the incidence of stem canker in controlled conditions.

**Table 3.2:** Incidence and severity (mean external necrosis length, mean necrosis score and standard error (se)) of stem canker in lines with (C119) or without (A30) polygenic resistance, in three experiments. Slopes and coefficients of determination of linear models relating internal necrosis length to external necrosis length for each line in each experiment are presented.

	DH line	Exp1	Exp2	Exp3
Incidence (%)	A30	24.28	74.65	55.56
	C119	8.57	16.67	32.56
Mean external necrosis length (mm) (se)	A30	2.90 (6.71)	20.31 (21.46)	11.96 (19.25)
	C119	0.66 (2.94)	2.09 (5.86)	0.99 (4.55)
Mean necrosis score (se)	A30	1.43 (1.09)	3.16 (2.20)	2.57 (2.21)
	C119	1.14 (0.63)	1.31 (0.92)	1.32 (0.69)
Internal necrosis length (mm) $Y = a + bX$ , with $X$ the corresponding external necrosis length (mm)				
regression slope $b$ ( $R^2$ )	A30	1.62 (0.81)	1.01 (0.79)	0.95 (0.91)
	C119	2.26 (0.73)	1.44 (0.79)	1.21 (0.63)

To assess the effect of the competing inoculum load on the probability for the initial isolate to colonise hypocotyl and on the probability for the competing isolate to colonise hypocotyl, generalized linear models were performed using the GENMOD procedure of SAS (SAS, 2000).

### 3. Results

#### 3.1 Plant growth conditions allowing stem canker development

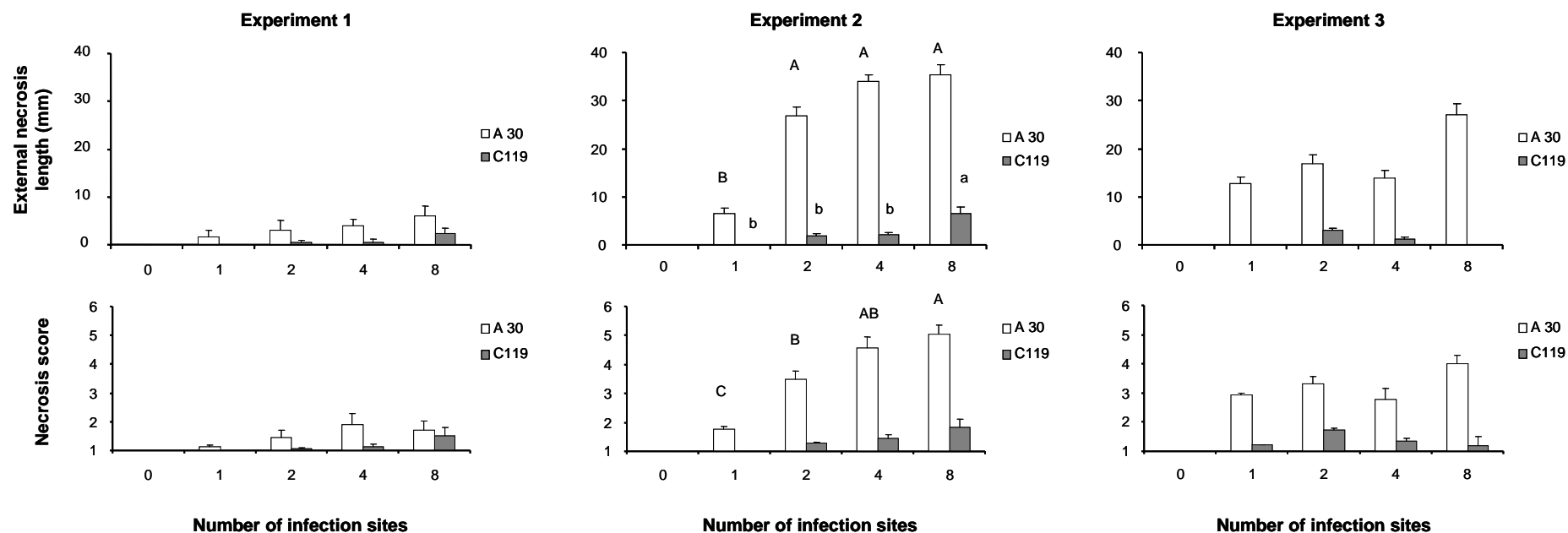
Twenty-one days after cotyledon inoculation (21 d.a.i), no plant had diseased hypocotyl. When plants had not been exposed to low temperature conditions (6°C), only a few plants grown for 4 or 6 weeks at 20°C since 21 d.a.i developed cankers and incidence was low (Fig. 3.5). When plants had been exposed for 4, 6 or 8 weeks to low temperature (6°C) since 21 d.a.i, disease incidence increased with the increasing number of subsequent weeks at 20°C. In the longest experiments, all tested plants developed stem cankers. To maximize disease incidence while minimizing the duration of the experiment, a temperature sequence of 4 weeks at low temperature (6°C) followed by 6 weeks at 20°C (Fig. 3.5) was retained as the standard procedure for all the experiments further described in this paper.

#### 3.2 Influence of the number of infection sites and of host polygenic resistance on incidence and severity of stem cankers

Incidence and severity (expressed as the external necrosis length and the internal necrosis score) of stem cankers differed significantly ( $P < 0.01$ ) between experiments, with experiment 2 > experiment 3 > experiment 1 (Table 3.2), except for incidence measured on the line C119, which was higher in experiment 3 than in experiment 2.

For each experiment and for each line, internal necrosis length could be estimated by external necrosis length because a linear model ( $Y = a + bX$ , where  $Y$  is the internal necrosis length and  $X$  the external necrosis length) linked these two variables. From this, we could deduce that  $(Y - Y_{mean}) = b(X - X_{mean})$  with  $Y_{mean}$  and  $X_{mean}$  the means of  $Y$  and  $X$  respectively. For each linear model applied to one line in one experiment, the coefficient of determination  $R^2$  was higher than 0.63 (Table 3.2). Covariance analysis revealed that the introduction of the external necrosis length to explain the internal necrosis length was sufficient, while the factor “number of infection sites” did not improve the explanatory value of the model. Values of slope  $b$  greater than 1 indicated that internal necrosis was slightly longer than external necrosis in all but one case.

In each of the three experiments, the polygenic resistance of the C119 line significantly ( $P < 0.01$ ) reduced disease incidence and severity (Table 3.2). For instance, in experiment 2



**Figure 3.6:** Effect of the number of cotyledon infection sites on the external necrosis length and necrosis score for two oilseed rape DH lines (A30: susceptible; C119: with polygenic resistance), three experiments. Means and standard errors are presented. Means followed by the same letter (upper case: A30; lower case: C119) are not significantly different according to the Student-Newman-Keuls-test ( $P < 0.05$ ).

where disease was the most severe, external necrosis length was up to 35 mm on susceptible A30 plants but only up to 6.5 mm on resistant C119 plants (Fig. 3.6).

On the susceptible line A30 and for the three experiments, disease severity (external necrosis length and necrosis score) increased with increasing number of infection sites on cotyledons (Fig. 3.6). The effect of the number of infection sites was significant ( $P < 0.05$ ) for experiments 2 where disease severity was higher than in experiment 1 and than in experiment 3. For instance maximal external necrosis length on plants from line A30 was up to 40 mm in experiments 2 and 3 but only up to 8 mm in experiment 1.

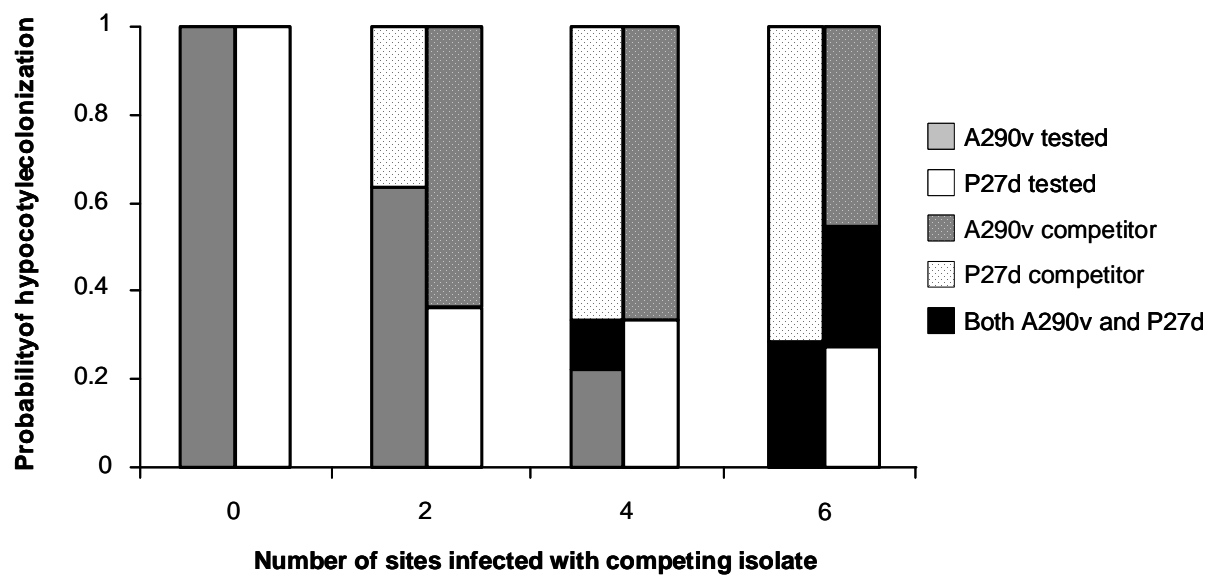
On the resistant line C119, disease severity increased with increasing number of infection sites on cotyledons only in experiments 1 and 2, the increase being significant in experiment 2 only (Fig. 3.6). Results were more ambiguous in experiment 3: external necrosis was visible only for 2 and 4 infections sites on cotyledons and their length was not significantly different. Necrosis score was significantly higher than 1 (healthy plant) where no external necrosis was visible but did not significantly differ among inoculated plants (1.22 and 1.20 for 1 and 8 infection points on cotyledons, respectively). In this experiment, resistant plants had internal necrosis without external necrosis.

### 3.4 Intraspecific competition

On DNA extracted from hypocotyl samples, *L. maculans* minisatellite markers were never amplified for control plants inoculated with distilled water but always amplified for the 56 plants with visible cankers. Both isolates were detected in 8 diseased plants which had been inoculated with at least 6 inoculum drops on cotyledons (Fig. 3.7).

The competing inoculum load had a significant effect on the presence of the isolates in hypocotyl either when the competing inoculum load “0” was considered ( $P < 0.001$  and  $P = 0.04$  for tested and competing isolates, respectively), or when only diseased plants were considered ( $P = 0.003$  and  $P < 0.001$  for tested and competing isolates, respectively) (Fig. 3.7). In plants with cankers, the probability of each isolate to colonise the hypocotyl was equal to 1 without competition (competing inoculum load “0”). For isolate A290v, the probability to colonise hypocotyl decreased with the increasing competing P27d inoculum load (Fig. 3.7). For isolate P27d, results were similar except its probability to colonise hypocotyl was higher for competing A290v inoculum load “6” than for competing A290v inoculum loads “2” and “4”, because tested isolate P27d was frequently detected with the competing isolate A290v inoculated at 6 infections sites (Fig.3.7). For both isolates the probability to colonise hypocotyl increased with their load on cotyledons when used as competing isolate (Fig. 3.7), but this effect was significant only for the competing isolate P27d.





**Figure 3.7:** Probability of hypocotyl colonisation by two competing isolates (tested isolate, inoculated at two infection sites on cotyledons, or competing isolate) on plants with external hypocotyl necrosis, according to the number of sites infected on cotyledons with the competing isolate.

Among the 59 visually symptomless plants tested, detection was successful in 14 plants (23%), of which 11 plants had been inoculated with at least 6 inoculum drops on cotyledons. For plants inoculated with at least 6 or 8 inoculum drops on cotyledons, the position of the tested isolate on cotyledons (low or high position) did not affect the probability of colonisation of the hypocotyl.

#### 4. Discussion

When Hammond *et al.* (1985) described the systemic stage of *L. maculans* mycelial growth in *Brassica napus* and Hammond & Lewis (1986) introduced the sequence of the five stages leading to stem cankers, suggestions from previous field observations that severe cankers at harvest were related to leaf infections (phoma leaf spots) in autumn (Brunin & Lacoste, 1970; Gladders & Musa, 1980) were validated. Next, several studies focused on the development of controlled conditions tests to screen for qualitative or quantitative resistance to *L. maculans* (Newman, 1984; Newman & Bailey, 1987; Xi *et al.*, 1991; McNabb *et al.*, 1993; Bansal *et al.*, 1994). However, not all the inoculation methods allow to characterize the full range of plant resistance mechanisms from hypersensitivity in the leaf or in the cotyledon to restricted growth in the stem. Here we propose a method in controlled conditions that allows the fungal systemic growth from cotyledon inoculation to stem cankers at hypocotyl and offers possibilities to study aggressiveness of *L. maculans* isolates and to assess the level of polygenic resistance to stem canker in *B. napus*.

Expression of cankers in plant was enhanced by exposing inoculated plants to low temperatures (6°C). These growing conditions did not inhibit the systemic growth of the fungus, which has been shown to achieve significant mycelial growth at temperatures as low as 3°C (Ndimande, 1976). Furthermore, these conditions simulate the temperature regime experienced by oilseed rape winter cultivars in Western Europe, where seedling development until the rosette stage occurs at the beginning of autumn when climatic conditions are temperate, followed by cold temperatures during winter inhibiting the plant growth. After a 4-week period at 6°C, plants were returned to a growth chamber at 20 ± 2°C for 6 weeks. Previous studies have shown that the transfer of inoculated, symptomless plants to warmer conditions induces a very rapid canker development (Brunin & Lacoste, 1970; Nathaniels & Taylor, 1983). We confirmed this observation, pointing out that plants which had not grown at 20°C after 4 weeks at 6°C exhibited lower stem canker incidence, and we revealed that increasing the growing period at 20°C from two to six weeks resulted in an increase in disease incidence. In agreement with previous results (Nathaniels & Taylor, 1983; Xi *et al.*, 1991) we were able to detect the fungus in visually symptomless plants.



However, our results suggest that the development of cankers in symptomless plants may have required a longer time period before assessment.

Disease incidence and severity displayed variability among our three experiments, being higher in experiment 2 than in experiment 3 and than in experiment 1. Before inoculation, plants were grown in a glasshouse for ten days; during this period, some variation in temperature, light intensity or relative humidity between experiments could have resulted in differences of plant physiological status at inoculation. However, all experiments were performed in the same growing chambers with only one week between repeats. A more likely hypothesis involves the conditions during the incubation period following inoculation. Germination of pycnidiospores of *L. maculans* and subsequent infection requires continuous wetness for at least 16 hours (Hall, 1992). We ensured high relative humidity by placing a plastic cover over inoculated plants, but in the absence of a reliable method of assessment of water films on leaf surfaces, we could not check the homogeneity of leaf wetness, a prerequisite to homogeneous mycelial colonisation of cotyledon lamina, among each experiment. Indeed interrupted wet periods have major effects on the establishment of several fungal diseases (Huber & Gillespie, 1992), especially in *L. maculans*, whose pycnidiospore germination is inhibited by short dry periods (Hall, 1992). Histological studies (Hammond & Lewis, 1987) have described three causes of failure to establish systemic biotrophic infection after inoculation. The first two causes (infection failure before lamina penetration; fungal restriction within 300 µm of the pin-prick margin after lamina penetration) can be rejected here because phoma leaf spots were actually observed 14 and 21 days after inoculation. The third possible cause (overtaken of the hyphal front by host cell necrosis and growth stop after lamina colonisation) could probably explain the inter-experiment variability in disease incidence and severity; intra-experiment variability was low as indicated by low standard errors on Figure 3.6. In order to reduce inter-experiment variability in disease incidence and severity, the first period of plant growth for ten days before inoculation could be carried out in a growth chamber, where conditions are better controlled than in a glasshouse.

Despite their variability, the three experiments all showed the same trend: disease severity increased with the number of infection sites on cotyledons. This result is in agreement with the dose-response relationship established by Hammond & Lewis (1987): with increasing inoculum spore concentration, the incidence of phoma leaf spots increased and an increasing proportion of phoma leaf spots generated more systemic biotrophic growth. The contrasted inoculation methods employed, *i.e.* different infection sites vs. one infection site differing by spore concentration at inoculation, have contrasted implications for the field



disease epidemiology. Our results suggest that high numbers of phoma leaf spots on a same plant, consecutive either to high ascospore showers or to secondary cycles implying pycnidiospore rain-splashed over short distances, could facilitate the establishment of the systemic biotrophic growth of the fungus, and then lead to severe phoma stem canker epidemics. Only phoma leaf spots from secondary cycles occurring in the early cropping season could have effects on disease severity: as previously demonstrated, only leaf infections established before the onset of rapid stem extension can significantly affect the final disease levels, moreover assuming the abscission of infected leaf occurs after the completion of the fungus systemic growth into the petiole (Hammond & Lewis, 1986).

The differential reaction between the susceptible A30 and resistant C119 lines indicates that our method could be used for the screening for quantitative resistance, while its potential use to differentiate more levels of host quantitative resistance remains to be tested. Evaluating levels of quantitative resistance in *B. napus* in controlled conditions is required to suppress the host genotype x environment interaction occurring in field studies (Newman & Bailey, 1987; Bansal *et al.*, 1994). Disease incidence and severity on plants with polygenic resistance were significantly decreased compared to susceptible plants, confirming previous field studies (Delourme *et al.*, 2006). This result emphasizes the potential effectiveness of polygenic resistance in managing phoma stem canker. Polygenic resistant cultivars do not affect leaf infections and are assumed to react equally across all *L. maculans* strains during stem colonisation. However, a polygenic resistant cultivar might exert a selection pressure on the pathogen population and promote the most aggressive strains, resulting in an increased aggressiveness at the population level. Our method could also be used to characterise pathogen aggressiveness (expressed both as the speed of stem colonisation and the resulting disease). Even if our two isolates were only slightly different in their ability to reach hypocotyl (Fig. 3.7), field studies have suggested that virulent isolates *avrLm4* are less competitive than avirulent isolates during growth down the petiole to reach the stem base of susceptible hosts (Huang *et al.*, 2006). A season-to-season pathogen population field survey on polygenic resistant cultivars combined with the experimental method proposed in this paper could assess the evolution of the population aggressiveness.

To our knowledge, *L. maculans* is the only phytopathogenic fungus which has an asymptomatic and biotrophic systemic growth into tissues of its host going down xylem vessels, in the opposite direction to the crude sap. In the course of systemic growth, competition and colonisation efficiency may determine which individuals will reach the site of sexual reproduction. Our results show that the hypocotyl colonisation efficiency of both studied isolates decreased when increasing the number of infection sites of the competing



isolate on cotyledons. Schmit *et al.* (2002) showed that only few *L. maculans* strains isolated from phoma leaf spots in the autumn could be reisolated from the basal stem canker before harvest, which can be explained by competition between fungal strains during systemic growth. Competition for resources between *L. maculans* and *L. biglobosa*, the two related species causing blackleg (Shoemaker & Brun, 2001), was already suggested during the saprophytic stage on oilseed rape stubble (West *et al.*, 2002). To better understand competition during systemic growth, which could be due either to spatial exclusion among hyphae or trophic competition at any step of the colonisation (in lamina, petiole, and stem), the use of fluorescent protein-expressing strains would be very helpful.

Apart from the direct consequences of disease development on yield, the systemic progress of *L. maculans* is a key stage for the fungus to access the site of sexual reproduction. Sexual reproduction is critical for small fungal populations, for instance in fields of oilseed rape varieties with a new major resistance gene, when the frequency of the matching virulence is low in the pathogen population. Sexual reproduction is the most effective way for the fungus to transmit its virulence to the next generation gene pool through wind-dispersed ascospores able to reach distant hosts in the next cropping season. Our results in controlled conditions suggest that at low *L. maculans* population densities, access to the site of sexual reproduction may depend on the number of phoma leaf spots per plant during the early susceptible stage. Hence the occurrence of early secondary cycles, generating clusters of secondary phoma leaf spots on the same plant, should promote systemic growth and therefore sexual reproduction at stem basis. In addition, competitive effects might affect strains during systemic growth, with a density-dependent relative colonisation success as reported in this paper. Our results confirmed that varieties with polygenic resistance reduce disease severity; a further step is to study if the ability of isolates to reach the stem and to mate sexually is subsequently reduced, too. This opens up strategies to delay pathogen population adaptation to specific resistances by cumulating them with polygenic resistance to prevent ascospore production.

## 5. Acknowledgements

This research is part of a PhD project funded jointly by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Région Bretagne. This work was carried out with the financial support of the Ministère de l'Agriculture et de la Pêche (CTPS 05-02 Phoma). The authors thank J.P. Masson for improving statistical analyses and for commenting on the paper during its preparation. We also thank H. Miteul for technical assistance.





## 6. References

- Ansan-Melayah D, Balesdent MH, Buée M, Rouxel T, 1995. Genetic characterization of *AvrLm1*, the first avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **85**, 1525-1529.
- Ansan-Melayah D, Balesdent MH, Delourme R, Pilet ML, Tanguy X, Renard M, Rouxel T, 1998. Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. *Plant Breeding* **117**, 373-378.
- Arthur W, 1987. The niche in competition and evolution. New-York, John Wiley and Sons.
- Aubertot JN, Sohbi Y, Brun H, Penaud A, Nutter FW, 2006a. Phomadidacte: a computer-aided training program for the severity assessment of phoma stem canker of oilseed rape. *IOBC Bulletin* **29**, 247-254.
- Aubertot JN, West JS, Bousset-Vaslin L, Salam MU, Barbetti MJ, Diggle AJ, 2006b. Improved resistance management for durable disease control: a case study of phoma stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 91-106.
- Baird RE, Phillips DV, Mullinix G, Alt PJ, 1999. Relative longevity of *Leptosphaeria maculans* and associated mycobiota on canola debris. *Phytoprotection* **80**, 1-11.
- Bansal VK, Kharbanda PD, Stringam GR, Thiagarajah MR, Tewari JP, 1994. A comparison of greenhouse and field screening methods for blackleg resistance in doubled haploid lines of *Brassica napus*. *Plant Disease* **78**, 276-281.
- Barbetti MJ, 1976. The role of pycniospores of *Leptosphaeria maculans* in the spread of blackleg disease in rape. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **16**, 911-913.
- Brunin B, Lacoste L, 1970. Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. II. Pouvoir pathogène des ascospores. *Annales de Phytopathologie* **2**, 477-488.
- De March G, Séguin-Shwartz G, Petrie GA, 1986. Virulence and culture filtrate phytotoxicity in *Leptosphaeria maculans*: perspectives for in vitro selection. *Canadian Journal of Plant Pathology* **8**, 422-428.
- Delourme R, Chèvre AM, Brun H, Rouxel T, Balesdent MH, Dias JS, Salisbury PA, Renard M, Rimmer SR, 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 41-52.
- Delourme R, Pilet-Nayel ML, Archipiano M, Horvais R, Tanguy X, Rouxel T, Brun H, Renard M, Balesdent MH, 2004. A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology* **94**, 578-583.



- Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR, 2006. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 3-15.
- Gladders P, Musa TM, 1980. Observations on the epidemiology of *Leptosphaeria maculans* stem canker in winter oilseed rape. *Plant Pathology* **29**, 28-37.
- Hall R, 1992. Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 46-55.
- Hammond KE, Lewis BG, 1986. The timing and sequence of events leading to stem canker disease in populations of *Brassica napus* var. *oleifera* in the field. *Plant Pathology* **35**, 551-564.
- Hammond KE, Lewis BG, 1987. The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **36**, 135-147.
- Hammond KE, Lewis BG, Musa TM, 1985. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **34**, 557-565.
- Huang YJ, Li Z-Q, Evans N, Rouxel T, Fitt BDL, Balesdent MH, 2006. Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 77-89.
- Huang YJ, Pirie E, Evans N, Delourme R, King GJ, Fitt BDL, 2007. Understanding symptomless growth of *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* (oilseed rape) to manage phoma stem canker. *Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress IV*, 14-16.
- Huber L, Gillespie TJ, 1992. Modeling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 533-577.
- Johnson RD, Lewis BG, 1994. Variation in host range, systemic infection and epidemiology of *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **43**, 269-277.
- Keddy PA, 1989. Competition. New-York, Chapman & Hall.
- Khangura R, Barbetti MJ, 2001. Prevalence of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) on canola (*Brassica napus*) in Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **41**, 71-80.
- Kutcher HR, van den Berg CGJ, Rimmer SR, 1993. Variation in pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica* spp. based on cotyledon and stem reactions. *Canadian Journal of Plant Pathology* **15**, 253-258.
- Li H, Sivasithamparam K, 2003. Breakdown of a *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* single dominant blackleg resistance gene in *B. napus* rapeseed by *Leptosphaeria maculans* field isolates in Australia. *Plant Disease* **87**, 752.



- McGee DC, 1977. Black leg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) of rapeseed in Victoria: sources of infection and relationships between inoculum, environmental factors and disease severity. *Australian Journal of Agricultural Research* **28**, 53-62.
- McNabb WM, Van den Berg CGJ, Rimmer SR, 1993. Comparison of inoculation methods for selection of plants resistant to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Canadian Journal of Plant Science* **73**, 1199-1207.
- Nathaniels NQR, Taylor GS, 1983. Latent infection of winter oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **32**, 23-31.
- Ndimande B, 1976. Studies on *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. and the dry rot of oil seed rape, *Brassica napus* (L.) var. *oleifera* Metzger. Uppsala, Agricultural College of Sweden. Ph.D. Thesis.
- Newman PL, 1984. Differential host-parasite interactions between oilseed rape and *Leptosphaeria maculans*, the causal fungus of stem canker. *Plant Pathology* **33**, 205-210.
- Newman PL, Bailey DJ, 1987. Screening for resistance to canker (*Leptosphaeria maculans*) in winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Plant Pathology* **36**, 346-354.
- Newton MR, Kinkel LL, Leonard KJ, 1997. Competition and density-dependent fitness in a plant parasitic fungus. *Ecology* **78**, 1774-1784.
- Petrie GA, Lewis PA, 1985. Sexual compatibility of isolates of the rapeseed blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* from Canada, Australia, and England. *Canadian Journal of Plant Pathology* **7**, 253-255.
- Pilet ML, Delourme R, Foisset N, Renard M, 1998. Identification of QTL involved in field resistance to light leaf spot (*Pyrenopeziza brassicae*) and blackleg resistance (*Leptosphaeria maculans*) in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **97**, 398-406.
- Pinochet X, Mestries E, Penaud A, Delourme R, Chèvre AM, Renard M, Brun H, Bousset L, Balesdent MH, Rouxel T, Aubertot JN, 2003. Towards a durable management of genetic resistances to *Leptosphaeria maculans*. *Oléagineux Corps gras Lipides* **10**, 208-211.
- Roughgarden J, 1979. Theory of population genetics and evolutionary ecology: an introduction. New-York, MacMillan.
- Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, Balesdent MH, 2003. A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 871-881.
- SAS, 2000. *Statistical Analysis System, SAS/STAT User's Guide, Version 8•1*. Cary, NC, USA, SAS Institute Inc.



- Schmit J, West J, Narcy JP, Roux J, Balesdent MH, Rouxel T, Gout L, 2002. La nécrose du collet du colza : analyse de la distribution du champignon dans la plante à l'aide d'outils moléculaires. *Oléagineux Corps gras Lipides* **9**, 2-3.
- Shoemaker R.A. and Brun H. 2001 The teleomorph of the weakly aggressive isolates segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany* **79**:412-419.
- Smith HC, Sutton BC, 1964. *Leptosphaeria maculans* the ascogenous state of *Phoma lingam*. *Transactions of the British Mycological Society* **47**, 159-165.
- Somda I, Delourme R, Renard M, Brun H, 1999. Pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* isolates on a *Brassica napus*-*B. juncea* recombinant line. *Phytopathology* **89**, 169-175.
- Sprague SJ, Balesdent MH, Brun H, Hayden HL, Marcroft SJ, Pinochet X, Rouxel T, Howlett B, 2006. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology* **114**, 33-40.
- Travadon R, Bousset L, Saint-Jean S, Brun H, Sache I, 2007. Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* **56**, 595-603.
- West J, Balesdent MH, Rouxel T, Narcy JP, Huang YJ, Roux J, Steed JM, Fitt BDL, Schmit J, 2002. Colonization of winter oilseed rape tissues by A/Tox<sup>+</sup> and B/Tox<sup>0</sup> *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England. *Plant Pathology* **51**, 311-321.
- West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL, 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**, 10-27.
- Xi K, Morrall RAA, Gugel RK, Verma PR, 1991. Latent infection in relation to the epidemiology of blackleg of spring rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* **13**, 321-331.





## ESTIMATION INDIRECTE DES DISTANCES DE DISPERSION DES ASCOSPORES DE *LEPTOSPHAERIA MACULANS*

Ce chapitre doit faire l'objet d'une publication à soumettre en juin 2008 au journal « *Environmental Microbiology* » (Article 3) :

R. Travadon, I. Sache, C. Dutech, L. Bousset, 2008 : High gene flow and random mating in *Leptosphaeria maculans* populations in France. *Environmental Microbiology*.

### 1. Problématique

La dispersion des ascospores, spores issues de la reproduction sexuée de *L. maculans*, est supposée s'effectuer sur des distances atteignant la dizaine de kilomètres (McGee, 1977), bien que les études directes par piégeage (plantes pièges ou pièges à spores actifs) révèlent des distances de dispersion plus courtes sur plusieurs centaines de mètres (Salam *et al.*, 2001; Marcroft *et al.*, 2004; Lô-Pelzer, 2008). Contrairement aux pycnidiospores, la dispersion des ascospores est donc susceptible de provoquer des flux de gènes de virulence entre parcelles de colza éloignées entre les saisons de culture. Il est donc primordial d'évaluer l'échelle spatiale à laquelle les flux de gènes sont effectifs pour élaborer des stratégies de déploiement spatial des variétés résistantes de colza.

Une dispersion spatiale limitée a pour conséquence une diminution de la quantité de spores transportées avec l'éloignement de la source. Le modèle initialement formulé par Wright (1943) de l'isolement par la distance prédit une différenciation génétique entre populations éloignées sous l'effet de la dérive génétique. Des approches théoriques récentes (Rousset, 1997 ; 2000), sous des conditions particulières (équilibre entre dérive génétique et migration, espèces à distribution continue, échelle spatiale adéquate, absence de sélection) permettent d'estimer un flux de gène historique : la moyenne sur plusieurs générations du produit de la variance de la distance de dispersion parent-descendant par la taille efficace des populations. Cette approche indirecte n'est donc pas facile à appliquer chez les champignons phytopathogènes mais la détection d'un patron d'isolement par la distance, par l'étude de la structuration génétique spatiale des populations, permet d'estimer l'échelle spatiale à laquelle les flux de gènes sont effectifs. Nous avons suivi cette approche indirecte plus facile à mettre en place que les approches directes déjà appliquées à *L. maculans* en Australie (Salam *et al.*, 2001) et en France (Lô-Pelzer, 2008) sur de longues distances. De



plus, le développement récent de nombreux marqueurs moléculaires associé aux techniques de biologie moléculaire standardisées permet de tester un grand nombre d'individus, en vue d'inférer des distances de dispersion des ascospores de *L. maculans*. D'autre part cette approche va aussi nous permettre d'évaluer la diversité génétique des populations de *L. maculans*, diversité souvent révélatrice des capacités d'adaptation d'un organisme aux conditions de son milieu.

Dans ce chapitre, à partir d'une étude de génétique des populations menée sur des populations naturelles de *L. maculans*, nous allons tenter de remplir les objectifs suivant :

- Examiner et interpréter la diversité génétique des populations françaises de *L. maculans*.
- Evaluer la différenciation génétique entre populations du champignon.
- Vérifier l'existence d'une corrélation entre les distances génétiques et géographiques entre populations qui nous permettrait d'approcher les capacités de dispersion de *L. maculans*.

## **2. Matériel et Méthodes** (pour une description détaillée se référer à l'article 3)

### **2.1 Echantillonnage, extraction des ADN fongiques et amplification des marqueurs minisatellites**

Au cours des automnes 2004 et 2005, des macules foliaires ont été prélevées dans 29 champs de colza provenant des régions Bretagne (17 champs) et Centre (12 champs). Les distances géographiques entre paires de populations ont varié de 400 m à 364 km. Dans chaque champ, de 23 à 25 macules ont fait l'objet d'isolements monopycnides du champignon, si bien qu'un total de 693 isolats a été obtenu. Des sous cultures des fronts hyphaux en croissance sur milieu malt gélosé ont permis la purification des isolats. A partir de la dernière sous culture mycélienne sur milieu V8 gélosé, les mycéliums de chaque isolat ont été collectés par grattage avec une lame de scalpel stérile. Ces mycéliums ont ensuite été hyophilisés et ont constitué le matériel fongique utilisé pour les extractions des ADN fongiques. Ces ADN ont été extraits en utilisant le kit d'extraction Nucleospin® Plant II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) et en suivant le protocole d'extraction standard. Huit marqueurs moléculaires minisatellites ont été amplifiés par PCR à partir des ADN extraits. Pour chaque marqueur, une des deux amorces permettant l'amplification était marquée par fluorescence. Pour chaque isolat, les allèles de chaque marqueur ont été séparés par



électrophorèse sur séquenceur à capillaire et leurs tailles ont été assignées en utilisant le logiciel Genemapper (version 3.7 Applied Biosystems).

## **2.2 Analyses des données**

Le génotype de chaque isolat a été construit en compilant les tailles de ses allèles pour les huit marqueurs minisatellites. Les isolats provenant d'un même champ ont été considérés comme formant une population. Pour chaque marqueur, les fréquences alléliques, le nombre d'allèles et la diversité génique ( $H_e$ ) ont été calculés à l'aide du logiciel SPAGEDI. Dans chaque population, le nombre moyen d'allèles par locus et la richesse génotypique ont été calculés.

Au sein de chaque population, le déséquilibre de liaison entre allèles par paires de loci a été estimé à l'aide du logiciel GENEPOP. L'indice de déséquilibre de liaison multilocus  $r_d$ , testant les associations préférentielles entre allèles pour l'ensemble des loci, a été calculé dans chaque population en utilisant le logiciel MULTILOCUS.

Pour chaque locus et sur l'ensemble des populations, les estimateurs de Nei de la différenciation génétique ( $G_{ST}$ ), indiquant la proportion de la variation génétique attribuable à la différenciation entre populations, ont été calculés avec le logiciel FSTAT. L'hypothèse nulle de non-différenciation génétique entre les populations a été également évaluée en utilisant FSTAT pour estimer  $\theta$  (Weir et Cockerham, 1984), l'estimateur du paramètre  $F_{ST}$ .  $\theta$  a été estimé pour examiner la différenciation génétique par paires de populations séparées spatialement.

Une analyse hiérarchique de la variance moléculaire (AMOVA) (logiciel ARLEQUIN) a été employée pour déterminer dans quelle mesure la variabilité génétique globale pouvait être attribuée à des différences entre les deux régions françaises étudiées, entre les champs dans une région, ou entre les individus dans un même champ.

L'isolement par la distance entre les populations a été testé par régression des estimateurs de  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  par paire de populations sur le logarithme de la distance géographique entre les populations. Le modèle d'isolement par la distance suggère une corrélation positive entre ces mesures. La significativité statistique de la corrélation a été évaluée par un test de Mantel disponible dans le logiciel GENEPOP.

**Tableau 4.1** : Localisation des populations de *Leptosphaeria maculans* (région, latitude et longitude), le nom des populations (Population), nombre des isolats analysés (*N*), nombre de génotypes observé (*G*), richesse génotypique (*R*), nombre moyen d'allèles par locus (*N<sub>all</sub>*), diversité génique moyenne (*H<sub>e</sub>*) et index du déséquilibre de liaison multilocus (*r<sub>d</sub>*).

Région	Latitude	Longitude	Population	<i>N</i>	<i>G</i>	<i>R</i>	<i>N<sub>all</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>r<sub>d</sub></i>
Bretagne	N47°43'35.0"	W1°06'39.2"	ARM	24	24	1	5.50	0.67	0.0 08
Bretagne	N48°03'24.4"	W1°51'30.1"	Bre1	24	24	1	5.00	0.62	0. 003
Bretagne	N48°01'58.7"	W1°54'06.5"	Bre4	25	25	1	5.88	0.66	-0 .011
Bretagne	N47°58'04.9"	W1°36'14.7"	CHL	24	24	1	6.00	0.65	< 0 .001
Bretagne	N48°27'33.5"	W1°19'55.6"	COG	23	23	1	5.75	0.66	-0. 037
Bretagne	N48°03'41.9"	W2°13'17.3"	Con1	24	24	1	6.25	0.70	-0 .019
Bretagne	N48°03'55.6"	W2°13'10.6"	Con2	24	23	0.96	6.00	0.6 6	0.041
Bretagne	N47°47'55.2"	W1°16'17.5"	EAN	24	24	1	5.88	0.66	-0. 014
Bretagne	N48°19'24.6"	W1°35'51.5"	FEI	24	24	1	5.88	0.64	0.0 08
Bretagne	N48°14'08.8"	W1°40'06.6"	GER	24	24	1	5.88	0.64	-0. 004
Bretagne	N48°05'31.6"	W2°14'42.8"	Ler	24	24	1	5.63	0.65	-0. 004
Bretagne	N48°34'53.9"	W1°30'32.2"	MSM	24	24	1	6.38	0.69	-0. 019
Bretagne	N47°59'58.0"	W2°10'04.9"	Pai3	23	23	1	5.25	0.65	-0 .018
Bretagne	N47°55'31.1"	W1°26'45."3	THE	24	24	1	7.00	0.67	0.0 01
Bretagne	N48°01'58.4"	W1°57'27.3"	Thu1	23	23	1	5.75	0.66	0. 009
Bretagne	N47°44'54.1"	W1°05'20."7	VER	24	23	0.96	5.63	0.65	0.028
Bretagne	N48°04'45.8"	W1°55'35.2"	Ver1	24	24	1	5.88	0.65	-0 .002
Centre	N47°02'58.7"	E2°20'31.1"	Bou1	24	24	1	6.13	0.69	0.01 3
Centre	N46°59'34.2"	E2°10'26.5"	Chr1	24	24	1	6.00	0.64	-0.0 2
Centre	N46°59'40.9"	E2°09'24.6"	Chr3	24	24	1	6.13	0.69	-0.0 08
Centre	N46°50'28.1"	E1°44'16.3"	Ch12	24	24	1	5.50	0.64	-0.00 8
Centre	N46°50'18.2"	E1°43'52.4"	Ch13	24	24	1	5.88	0.65	-0.00 9
Centre	N47°01'34.1"	E2°17'44.1"	Flo1	23	23	1	6.63	0.68	-0.01 5
Centre	N46°59'45.8"	E2°16'05.5"	Flo3	24	24	1	5.63	0.64	0.016
Centre	N46°59'19.2"	E2°13'17.2"	Flo4	24	24	1	6.63	0.67	0.038
Centre	N46°56'17.8"	E1°58'03.1"	Iss2	24	24	1	6.13	0.66	0.018
Centre	N46°55'38.2"	E1°56'27.6"	Iss3	24	23	0.96	5.63	0.62	0. 01
Centre	N47°47'18.0"	E1°08'56.0"	Sel13	24	24	1	4.88	0.62	0.03 1
Centre	N47°42'57.0"	E1°15'15.0"	Sel18	24	24	1	5.75	0.65	0.00 4

### 3. Résultats

#### 3.1 Diversité génétique au sein des populations

Dans l'ensemble des 29 populations, le nombre d'allèles par locus a varié de 3 à 21 pour les loci *MinLm4* et *MinLm632* respectivement, et la diversité génique moyenne était comprise entre 0,05 (*MinLm4*) et 0,87 (*MinLm2*). La richesse allélique estimée par population était élevée, de 4,88 à 7 dans les populations Sel13 (région Centre) et THE (région Bretagne) respectivement. La diversité génique moyenne sur les huit loci était haute et homogène dans les 29 populations, de 0,62 à 0,70. Parmi les 693 isolats analysés, 687 génotypes ont été obtenus avec les huit loci minisatellites. Trois génotypes ont été détectés deux fois dans la même population et trois autres génotypes identiques ont été détectés deux fois dans des populations éloignées d'une distance maximale de 250 km. Tous les isolats avaient des génotypes différents, excepté dans trois populations où la richesse génotypique restait élevée (0,96) (Tableau 4.1).

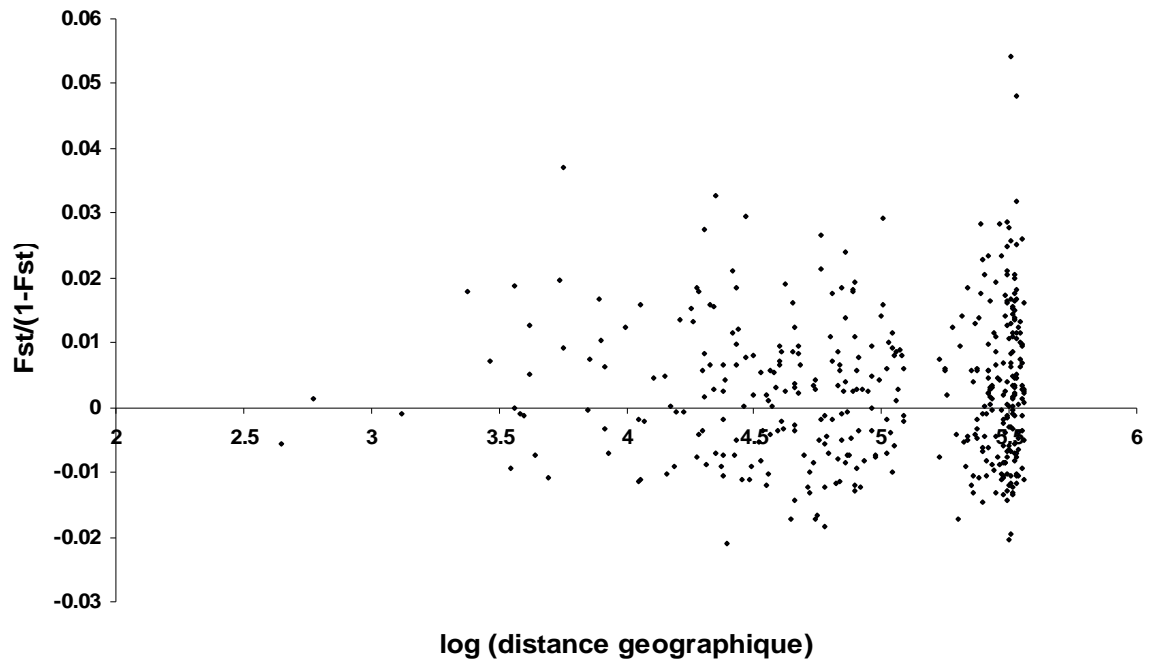
#### 3.2 Déséquilibres de liaison

Dix sept populations ont montré une association aléatoire de tous les allèles à tous les loci. Un déséquilibre de liaison non significatif entre paires de loci a été trouvé dans 801 des 812 comparaisons (98,6%) suggérant leur association aléatoire. L'indice du déséquilibre de liaison multilocus était faible et non-significatif dans toutes les populations, compris entre -0,019 à 0,041, avec l'hypothèse nulle d'association aléatoire acceptée dans toutes les populations. Quand le jeu de données complet a été analysé en tant qu'un seul groupe, aucune des comparaisons de paires de loci n'a montré de déséquilibre de liaison significatif.

#### 3.3 Diversité génétique entre les populations

L'AMOVA a indiqué que plus de 97 % de la variabilité génétique était distribuée à l'intérieur des populations. Seulement 2,56% de la variabilité génétique a pu être attribuée à des différences entre populations d'une région, et 0,06% de la variabilité génétique a pu être attribuée à des différences entre les régions. Ces résultats étaient conformes aux évaluations d'une faible différenciation génétique entre les populations par les estimations du paramètre  $F_{ST}$ . Les valeurs des estimateurs  $\theta$  de  $F_{ST}$  entre paires de populations étaient comprises entre -0,02 et 0,05, avec une valeur moyenne de 0,003 (+/- 0,002). Aucune des comparaisons entre paires de populations n'a montré de différenciation génétique significative ( $P < 0.05$ ). La valeur maximale de  $F_{ST}$  (0.05) a été atteinte pour la comparaison





**Figure 4.1** : Estimateurs  $\theta$  de  $F_{ST}$  exprimés par le ratio  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  pour chaque paire de populations en fonction du logarithme de la distance géographique (km) séparant les populations de *Leptosphaeria maculans*.

entre les populations Iss3 et Ver1 séparées géographiquement par 318 kilomètres et prélevées dans les deux régions françaises étudiées. Cependant aucune corrélation significative n'a été trouvée entre le logarithme de la distance géographique séparant les populations et leur distance génétique exprimée par le rapport  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ , que ce soit à l'échelle spatiale globale (Figure 4.1) ou à l'échelle régionale. À ces échelles ces résultats ne soutiennent pas le modèle d'isolement par la distance, c'est-à-dire une augmentation de la différenciation génétique avec l'augmentation de la distance géographique entre les populations.

#### 4. Conclusions – Discussion

Au sein des populations françaises de *L. maculans* étudiées les niveaux de diversité génique et génotypique étaient très élevés. Ces résultats sont conformes à ceux d'études précédentes au Canada (Mahuku *et al.*, 1997), en Australie (Barrins *et al.*, 2004; Hayden *et al.*, 2007), et en France (Gout *et al.*, 2006). Cette diversité génotypique très élevée, associée à l'absence de déséquilibre de liaison dans toutes les populations, suggère l'importance de la reproduction sexuée dans le cycle de vie de *L. maculans* en France. Ces résultats confirment le rôle majoritaire des ascospores dans le développement des épidémies de Phoma.

L'absence de structuration génétique spatiale, révélée par l'homogénéité génétique entre les populations quelle que soit la distance géographique les séparant suggère d'importants flux de gène à l'échelle spatiale étudiée et laisse penser que la dispersion des ascospores peut atteindre des distances plus importantes que celles décrites dans la littérature. L'absence de structuration génétique spatiale pourrait aussi être due à de grandes tailles de populations du champignon, notamment entre les saisons de culture. Les grandes tailles de populations limitent les effets de la dérive génétique et permettent le maintien d'une grande diversité génétique dans les populations. Dans ces conditions même une dispersion limitée des spores n'est pas détectable par analyse de la différenciation génétique.

A notre échelle d'étude, l'absence de différenciation génétique entre populations éloignées géographiquement ne nous permet pas de raisonner la séparation géographique entre parcelles ou entre régions de culture dans le cadre d'une stratégie de déploiement spatial des résistances spécifiques du colza. Les flux de gènes importants interrogent sur la diffusion spatiale des allèles de virulence et sur l'échelle à laquelle ces flux sont significatifs. Des études à des échelles plus vastes pourraient permettre d'enrichir nos connaissances sur les capacités de dispersion de *L. maculans*.



## High gene flow and random mating in *Leptosphaeria maculans* populations in France

R. Travadon <sup>a</sup>, I. Sache <sup>b</sup>, C. Dutech <sup>c</sup>, A. Stachowiak <sup>d</sup> and L. Bousset <sup>a</sup>

<sup>a</sup> INRA, Agrocampus Rennes, Univ. Rennes 1, UMR1099 BiO3P (Biology of Organisms and Populations applied to Plant Protection), 35653 Le Rheu, France

<sup>b</sup> INRA, AgroParisTech UMR1290 BIOGER - CPP, 78850 Thiverval Grignon, France

<sup>c</sup> INRA-Univ. Bordeaux 1 UMR1202 BGE, 33612 Cestas, France

<sup>d</sup> Institute of Plant Genetics, Polish academy of sciences, Strzeszynska 34, PL-60479 Poznan, Poland

### Abstract

Plant pathogen dispersal has a great influence on the pattern of local adaptation to their host. Restricted dispersal in space causes genetic differentiation among populations, so that the examination of spatial genetic structure in natural populations can allow demographic inferences such as dispersal distances of an organism. From 29 oilseed rape field populations of *Leptosphaeria maculans* collected in France, in two regions differing by oilseed rape growing areas, the genetic structure was determined using eight polymorphic minisatellite markers. In the two regions sampled, all populations had high levels of gene diversity ( $H = 0.62$  to  $0.70$ ) and genotypic diversity. No linkage disequilibrium between the minisatellite loci was detected, supporting the prevalence of panmictic sexual reproduction in each field population. More than 97 % of the global genetic diversity was present within field population. No significant correlation was found between genetic and geographic distances between populations, and genetic differentiation among populations was low ( $F_{ST} < 0.05$ ). In field populations from Brittany region, where oilseed rape is an expanding crop, signatures of population demographic expansion were not detected from the observation of heterozygosity and allelic richness. These results are in agreement with high gene flow among French populations of *L. maculans* and so large effective population sizes, three processes conferring high evolutionary potential to the pathogen against the deployment of resistant oilseed rape cultivars.



## 1. Introduction

Migration, i.e. dispersal and establishment of individuals resulting in gene flow, shape the evolution of populations: migration constitute a source of a novel genetic material into isolated populations, migration promotes genetic homogenization between populations and can also result in the foundation of new populations. Plant pathogen dispersal has a great influence on the pattern of local adaptation to their host (Gandon *et al.*, 1996; Kaltz & Shykoff, 1998), especially in agricultural ecosystems where pathogen migration is largely favoured compared to their host plants, allowing the spatial diffusion of virulence alleles. Most fungal spores are dispersed over relatively short distances and the amount of spores decreases rapidly with increasing distance from the source (Gregory, 1973). However, cumulative successive dispersal-infection-dispersal sequences can result in appreciable distances being covered rapidly (Burnett, 2003). More widespread dispersal occurs when spores escape from the laminar boundary layer and are carried higher by atmospheric turbulence (Aylor, 1990). These long distance dispersal events are rare and stochastic (Nathan *et al.*, 2003) but these events can be very relevant in the worldwide spread of plant diseases (Brown & Hovmoller, 2002). As the dispersal modes by which aerial plant pathogens move are often not clear and consensual, and direct measures are difficult to apply for long distance dispersal events, indirect measures based on the examination of the spatial genetic structure of an organism can decipher these processes.

Restricted dispersal in space, and so restricted gene flow between populations, may generate a genetic structure related to the isolation by distance model (Wright, 1943). This occurs in subdivided populations, when gene flow between populations decreases with increasing geographic distances. In this case, the allelic frequencies are more similar between geographically close populations than between distant populations. Recent theoretical advances based on population genetics allow new demographic inferences from isolation by distance processes, such as dispersal distance and effective population density (Rousset, 1997; 2000). To test the isolation by distance pattern, Rousset (1997) formulated a model assuming that neutral genetic structure is essentially due to genetic drift and counterbalanced by gene dispersal; this model predicts an increase of genetic differentiation with geographical distance. The method derived from this model, used punctually in pathogenic fungal population genetic studies, requires assumptions as mutation-drift equilibrium and continuous population. Predictions depend also of the scale of study because estimators of genetic differentiation between pairs of populations are expected to decrease linearly with the logarithm of geographic distance only for distances  $d$  in the range of  $\sigma > d > 20\sigma$ , where  $\sigma^2$  is the second moment of parent-offspring distance (Rousset, 2000).



Most of the studies detecting isolation by distance patterns for airborne plant pathogens were conducted at larger scales (*i.e.* continental), where spatial genetic structure is influenced by others factors that genetic drift and gene dispersal and could reflect stochastic and long distance colonisation events in the past (Linde *et al.*, 2002; Zaffarano *et al.*, 2006). At these large spatial scales, physical barriers (mountains, seas) are likely to constitute barriers to gene flow resulting in genetic and stochastic differentiation between populations (Manel *et al.*, 2005). Hence the large arid desert between western and eastern Australia could explain the genetic differentiation between *L. maculans* (Hayden *et al.*, 2007) and *Rynchosporium secalis* (McDonald *et al.*, 1999) populations from these two regions. In populations of the plant pathogen fungus *Melanpsora larici-populina* at the European scale, Barrès *et al.* (2008) detected both isolation by distance patterns and stochastic long dispersal events at the intercontinental scale through autocorrelogram analysis. Therefore these fungal studies illustrated that estimations of spatial genetic structure depend on the sampling design and that Rousset's method do not allow to discriminate systematically the gradual spread of disease through local dispersal from long and stochastic dispersal events. Also the detection of isolation by distance patterns through this method requires the absence of random genetic structures, for instance no insertion of isolated and recently founded populations in the analysis, at the risk of erroneously concluding on dispersal abilities of an organism.

In the present study we propose to assess *Leptosphaeria maculans* gene flow through indirect method testing the isolation by distance model formulated by Rousset (1997). *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & de Not. (anamorph *Phoma lingam* tode ex Fr.), a heterothallic haploid dothideomycete fungus, is the causal agent of Phoma stem canker, a world-wide disease of *Brassica* crops (*Brassica napus*, *B. rapa* and *B. juncea*), causing important yield losses in Europe, Canada and Australia (Fitt *et al.*, 2006). In France oilseed rape (*B. napus*) is essentially grown as a winter crop from September to June. The fungus life cycle matches its host presence. A single sexual reproduction per season occurs during summer on infected oilseed rape stubble remaining from the previous growing season (Hall, 1992; West *et al.*, 2001). From pseudothecia formed on stubble airborne ascospores are discharged during autumn and infect seedlings. Initial infections produce leaf lesions (phoma leaf spots) on which pycnidia (asexual fruiting bodies) containing numerous splash-dispersed conidia are formed. Conidia may then act as secondary inoculum and allow disease spread to neighbouring leaves or plants. Following initial necrotrophic infection of the leaf, mycelial hyphae grow down the vascular tissue of the petiole to the stem in a biotrophic, systemic and visually symptomless way, and finally cause stem cankers during spring and eventually lodging and death of the plant (Hammond & Lewis, 1986). After plant death, the fungus colonizes the stubble where sexual recombination occurs and result in pseudothecia

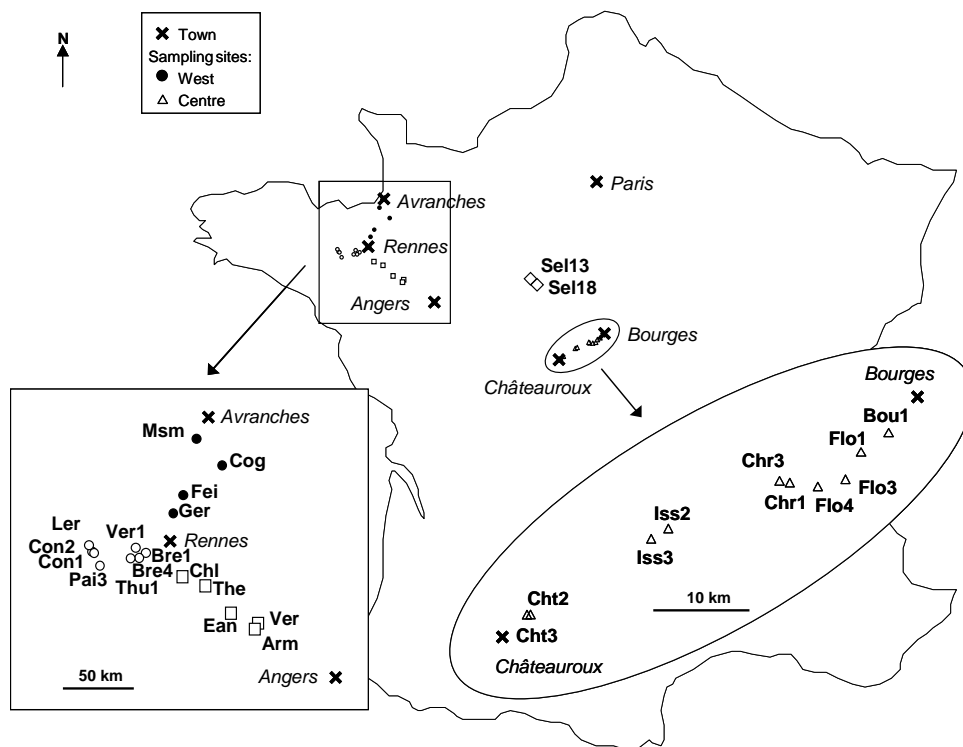




formation, the main source of inoculum for the next growing season. Windborne ascospore dispersal is spatially limited and can reach 8 to 10 km (McGee, 1977), but most ascospores are released until few hundred meters from the previous year's crop (Salam *et al.*, 2001; Marcroft *et al.*, 2004). From this knowledge of ascospore dispersal, we can expect isolation by distance patterns occur in natural populations separated by geographic distances ranging from few hundred meters to some ten kilometres.

The growth of *B. napus* resistant cultivars is the most widely used method to control the disease. Two kinds of disease resistance are present in *B. napus*. First type is polygenic, mediated by Quantitative Trait Loci and expressed at the adult plant stage (Delourme *et al.*, 2006). Second type is specific and is based on the gene-for-gene interaction between avirulence genes in *L. maculans* (*AvrLm*) and the matching major resistance genes in *B. napus* (*Rlm*) (Ansan-Melayah *et al.*, 1998). Their effectiveness under field conditions can last several years provided the prevalence of the corresponding avirulent strains in the pathogen population. Restricted ascospore dispersal should reduce gene flow between field populations of *L. maculans* and so limit virulence gene exchanges between spatially separated pathogen field populations. Integration of pathogen dispersal impacts disease management (Jeger, 1999) and could open possibilities to control phoma stem canker by managing the deployment of *B. napus* cultivars harbouring different major gene resistance in a spatial way which prevents virulent ascospore colonisation (Aubertot *et al.*, 2006). This implies knowledge about the scale at which gene flow between populations occur.

Genetic diversity of *L. maculans* has been studied at different geographical scales using a variety of genetic markers. At the continental scale, AFLP analysis could differentiate Australian, North American and European populations (Purwantara *et al.*, 2000). Across the Australian continent, Barrins *et al.* (2004) did not reveal genetic differentiation among populations from Eastern and Western Australia using AFLP and RFLP analysis, although Hayden *et al.* (2007) showed the east-west genetic differentiation through microsatellite and minisatellite analysis. In Canada, RAPD analysis could genetically differentiate two field populations distant from 20 km (Mahuku *et al.*, 1997). Inconsistently, four field populations from France showed low genetic differentiation after determining genetic structure with minisatellite markers (Gout *et al.*, 2006). All these previous studies of genetic variability in *L. maculans* populations found high levels of genetic variability within a field, some even revealing the fine scale (single plant, 2-m<sup>2</sup> field plot) distribution of genetic variability, and all supporting the prevalent role of sexual reproduction in *L. maculans* life cycle. From these studies, inferences about dispersal distances reached by ascospores remain difficult. The



**Figure 4.2:** Location of the 29 French field populations sampled. Each region (Brittany and Centre) sampled is indicated in an enlarged panel.

examination of the spatial genetic structure of *L. maculans* in a continuous habitat without physical barriers to gene flow is lacking.

The objectives of this work were to determine the genetic diversity of *L. maculans* French field populations using minisatellite loci, to evaluate the genetic differentiation among field populations and to test the isolation by distance pattern in two French regions differing by oilseed rape growing areas. We also aimed to compare the genetic structure of field populations between these two regions sampled and to examine whether pathogen population expansion matching expansion of host cultivation in Brittany can be detected.

## 2. Experimental procedures

### *Sample collection and DNA extraction*

A total of 693 isolates was collected from 29 oilseed rape commercial fields in France in autumns 2004 and 2005. The fields were located in western (Region Brittany, n = 17) and central (Region Centre, n = 12) France (Figure 4.2). These two regions (Region Brittany, western France, and region Centre, central France) differ for oilseed rape growing areas. For instance in 2006 in central France oilseed rape growing areas reached 39800 ha in the department Cher whereas they only reached 6360 ha in the department Ille-et-Vilaine in western France ([www.prolea.com](http://www.prolea.com)). At the global scale, pair wise distances between field populations ranged from 400 m to 364 km; pair wise distances ranged from 0.44 to 99.7 km and from 1.32 to 114.5 km in Region Brittany and in Region Centre respectively. In each field, one leaf with phoma leaf lesions was collected from 23-25 infected plants located in three distinct areas separated by a minimal distance of 30 meters; in each area, plants were at least distant by two meters from each other. Monopycnidial isolated were obtained from leaf lesions. Purification of the resulting mycelial cultures on malt medium was achieved as subcultures of hyphal tips. Mycelial cultures were maintained on V8 juice agar at 20°C for 21 days and mycelia were harvested with a sterile scalpel and lyophilized. DNA was extracted from lyophilized mycelia following the standard protocol supplied in the Nucleospin® Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

### *Minisatellite amplification*

Eight minisatellite markers were used to characterize multilocus genotypes in 693 isolates. Primer sequences for the minisatellite loci, *MinLm2*, *MinLm4* and *MinLm6*, were previously described by Eckert *et al.* (2005) and primer sequences for the minisatellite locus *MinLm5*

**Table 4.2:** Minisatellite markers and PCR primers used in this study

Minisatellite	Accession number <sup>b</sup>	Minisatellite Consensus (5' - 3')	Consensus length (bp)	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)
MinLm2 <sup>a</sup>	AJ294758	GAGACATGGGAA- -ATAGAGGAGGAA	24	MinLm2F	AAGAAGGTGGGTGGATTGGTAAG	60
MinLm4 <sup>a</sup>	AJ621803	ACAACTTCAATCCGCCTGCTGATTA- -TCCCTATACATATCAGACCAAGCAAG	51	MinLm4F	ACCAGGTGGAGTTGATAACAT	53
MinLm5 <sup>a</sup>	AJ621804	ACCGCCAGCCACTCA	16	MinLm4R	TCCTGCGAATCCCATTAG	60
MinLm6 <sup>a</sup>	AJ621805	GGCAGGGCTGGCCATGGGA	21	MinLm5-ULG	GCCGCCGCGCCTTACC	60
MinLm8	-	TGTATATACAGTAC- -AAAGACACACACA	27	MinLm5-LLG	GAGCTCCTGCGCCACAGTG	53
MinLm9	-	GTGTGTGTGTGCGTGTGT	18	MinLm6F	GGAAGGAACACACGGTGAC	53
MinLm632	-	CTCTGTCTTTCTCT- -TTCTCTCTCTCTGT	28	MinLm6R	AATTGAATGATTTGCGACACA	53
MinLm1377	-	TTGTCGGATGTCCCCTGT- -CCTGTC TTGTGCTGTGTC	36	MinLm8F	ATTTGCTGGC GGTGTAGGTA	53
				MinLm8R	TGTTTG TACATGTGGTAAGTAAAGCA	60
				MinLm9F	GCATTTGTTGGCTGGCATTGGA	60
				MinLm9R	TGCGTTGGCGTGTGACATGACT	64
				MinLm632F	TCAGACGCTGCTGGCCTGTGTG	64
				MinLm632R	AGTGAGCCGACGAGACGCGAGAG	64
				MinLm1377F	CGTCCAGTCGTGCCTGCC TTTG	64
				MinLm1377R	GGTGCATGTCTTGGCGGACCATT	

<sup>a</sup> Eckert et al. (2005)<sup>b</sup> EMBL database accession number

were described by Gout et al. (2006) (Table 4.2). Four additional minisatellite loci were used: *MinLm8*, *MinLm9*, *MinLm632* and *MinLm1377* for which primers were designed (Table 4.2). Forward primers were fluorescently labelled. PCR reactions were performed in a 20- $\mu$ l final volume containing 10-30 ng of genomic DNA, 1X PCR buffer, 200  $\mu$ M of each dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, each primer at 0.5  $\mu$ M, 0.25 U GoTaq® DNA Polymerase (Promega, WI, USA). Amplifications were carried out in a G-STORM GS4 thermocycler (GRI Ltd., Braintree, UK) using one cycle of 94°C for 4 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, annealing temperature for 30 s (Table 4.2), 72°C for 1 min, and 5 min of final extension at 72°C. Allele assignments were on an ABI PRISM® 3130xl sequencer using manufacturer's instructions with the program Genemapper version 3.7 from Applied Biosystems.

### *Data analysis*

Multilocus haplotypes were constructed for each isolate by compiling the alleles at all loci. All isolates collected within the same oilseed rape field were considered as one population. For each locus and for each field population, the mean number of alleles by locus ( $N_{all}$ ), the Nei's gene diversity corrected for sample size ( $h$ ) (Nei, 1987) and the allele frequencies were estimated using SPAGeDI version 1.2 (Hardy & Vekemans, 2002). The mean gene diversity ( $H$ ) was the mean of  $h$  over loci within each population. In each population genotypic richness ( $R$ ) was estimated as  $R = (G-1) / (N-1)$ , with  $G$  the number of unique genotypes and  $N$  the number of isolates analysed (Dorken & Eckert, 2001).

For each pair of loci within each population, gametic linkage disequilibria were computed by using GENEPOP version 4.0 software (Raymond & Rousset, 1995). For each contingency table created for all pairs of loci in each population, the null hypothesis of 'genotypes at one locus are independent from genotypes at the other locus' is tested through the computation of the log likelihood ratio statistic (G-test) using the Markov chain algorithm of Raymond & Rousset (1995). Associations of alleles among loci were also tested using the index of multilocus gametic disequilibrium  $r_d$  (Agapow & Burt, 2001), which tests whether two individuals having the same alleles at one locus makes them more likely to have the same alleles at another locus.  $r_d$  is expected to equal 0 if there is no linkage disequilibrium.  $r_d$  was computed for each field population. The significance of  $r_d$  was tested by comparing the observed variance with the distribution of the variance expected under the null hypothesis of random mating, as determined from 1000 randomizations of the haplotype data implemented in MULTILOCUS version 1.3 (Agapow & Burt, 2001).

**Table 4.3:** Frequencies of the most common minisatellite alleles, gene diversity (h) and number of alleles at the eight minisatellite loci and Nei's coefficient of population differentiation ( $G_{st}$ ) per locus across the 29 field populations of *Leptosphaeria maculans*.

Minisatellite	Allele	Allele frequency	h (gene diversity)	Number of alleles	Gst <sup>a</sup>
MinLm2	6X	0.23	0.87	20	0.001
	7X	0.15			
	8X	0.07			
	9X	0.19			
MinLm4	3X	0.97	0.05	3	-0.008
MinLm5	7X	0.55	0.58	6	-0.01
	8X	0.34			
MinLm6	3X	0.11	0.65	8	0.009
	4X	0.44			
	5X	0.37			
	6X	0.06			
MinLm8	5X	0.13	0.77	14	0.008
	6X	0.26			
	7X	0.36			
	8X	0.14			
MinLm9	3X	0.14	0.85	17	-0.001
	5X	0.13			
	6X	0.16			
	7X	0.05			
	9X	0.26			
	10X	0.07			
	11X	0.11			
MinLm632	4X	0.15	0.77	21	0.008
	7X	0.41			
	8X	0.10			
	18X	0.15			
MinLm1377	4X	0.11	0.84	13	0.003
	5X	0.20			
	6X	0.28			
	7X	0.14			
	8X	0.08			

<sup>a</sup> Nei's coefficient of population differentiation

For each locus and over all populations, Nei's estimators of genetic differentiation ( $G_{ST}$ ), indicating the proportion of the total genetic variation attributable to population differentiation, was calculated with the FSTAT software (Goudet, 1995). The null hypothesis of no genetic differentiation between field populations was also tested using FSTAT to estimate  $\theta$  (Weir & Cockerham, 1984), an unbiased estimator of the parameter  $F_{ST}$ .  $\theta$  was estimated to examine pairwise differences between field populations separated spatially. Significance levels were determined after Bonferroni corrections based on the adjusted P-value following 8000 permutations. Genetic differentiation between field populations over all loci was considered significantly different from 0 at the 5% nominal level. Genetic differentiation was estimated with a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) using the ARLEQUIN software version 3.1 (Excoffier *et al.*, 2000). AMOVA was used to determine how much genetic variation could be partitioned among the two French regions sampled, among fields within a region, or among individuals within a field. The number of permutations to test for significance was set at 5000.

Isolation by distance between field populations was tested using the Rousset's (1997) method under which a correlation is expected between the logarithm (assuming a gene flow in a two-dimensional environment) of the geographical distance and Rousset's genetic distance  $\theta / (1 - \theta)$ . This model predicts an increase of genetic differentiation with geographical distance at a rate proportional to  $1 / D\sigma^2$ , where  $D$  is the effective population density and  $\sigma^2$  the second moment of axial parent-offspring distance. The method of data analysis involves the regression of  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  estimates for pair of subpopulations on logarithm of geographic distance in two-dimensional habitats. The inverse of the slope of the regression line gives an estimate of  $4\pi D\sigma^2$ . Pair-wise geographical distances among field populations were calculated without correcting for the Earth's curvature because of the limited spatial range among field populations (a maximal separation of 364 km). Significance in the isolation-by-distance relationship was tested statistically using a Mantel test (1000 permutations) implemented in the GENEPOP software. Isolation by distance was tested over all field populations and among field populations within a region.

A test to detect whether field populations from Region Brittany experienced recent demographic fluctuations was performed with the program BOTTLENECK (Piry *et al.*, 1999). The program computes for each population and for each locus the distribution of heterozygosity expected from the number of alleles and the sample size under the assumption of mutation-drift equilibrium. The gene diversity expected under no recent changes in effective population size ( $H_a$ ) is compared to the observed gene diversity ( $H_e$ ) to test whether there is a heterozygosity excess or deficiency at each locus. In a bottlenecked



**Table 4.4:** French *Leptosphaeria maculans* population locations (region, latitude and longitude), field population name, number of analysed isolates ( $N$ ), number of genotypes observed ( $G$ ), genotypic richness ( $R$ ) mean number of alleles over the eight loci ( $N_{all}$ ), mean gene diversity ( $H_e$ ) and index of multilocus linkage disequilibrium ( $r_d$ )

Region	Latitude	Longitude	Population	$N$	$G$	$R$	$N_{all}$	$H_e$	$r_d$
Brittany	N47°43'35.0"	W1°06'39.2"	ARM	24	24	1	5.50	0.67	0.0 08
Brittany	N48°03'24.4"	W1°51'30.1"	Bre1	24	24	1	5.00	0.62	0. 003
Brittany	N48°01'58.7"	W1°54'06.5"	Bre4	25	25	1	5.88	0.66	-0 .011
Brittany	N47°58'04.9"	W1°36'14.7"	CHL	24	24	1	6.00	0.65	< 0 .001
Brittany	N48°27'33.5"	W1°19'55.6"	COG	23	23	1	5.75	0.66	-0. 037
Brittany	N48°03'41.9"	W2°13'17.3"	Con1	24	24	1	6.25	0.70	-0 .019
Brittany	N48°03'55.6"	W2°13'10.6"	Con2	24	23	0.96	6.00	0.6 6	0.041
Brittany	N47°47'55.2"	W1°16'17.5"	EAN	24	24	1	5.88	0.66	-0. 014
Brittany	N48°19'24.6"	W1°35'51.5"	FEI	24	24	1	5.88	0.64	0.0 08
Brittany	N48°14'08.8"	W1°40'06.6"	GER	24	24	1	5.88	0.64	-0. 004
Brittany	N48°05'31.6"	W2°14'42.8"	Ler	24	24	1	5.63	0.65	-0. 004
Brittany	N48°34'53.9"	W1°30'32.2"	MSM	24	24	1	6.38	0.69	-0. 019
Brittany	N47°59'58.0"	W2°10'04.9"	Pai3	23	23	1	5.25	0.65	-0 .018
Brittany	N47°55'31.1"	W1°26'45."3	THE	24	24	1	7.00	0.67	0.0 01
Brittany	N48°01'58.4"	W1°57'27.3"	Thu1	23	23	1	5.75	0.66	0. 009
Brittany	N47°44'54.1"	W1°05'20."7	VER	24	23	0.96	5.63	0.65	0.028
Brittany	N48°04'45.8"	W1°55'35.2"	Ver1	24	24	1	5.88	0.65	-0 .002
Centre	N47°02'58.7"	E2°20'31.1"	Bou1	24	24	1	6.13	0.69	0.01 3
Centre	N46°59'34.2"	E2°10'26.5"	Chr1	24	24	1	6.00	0.64	-0.0 2
Centre	N46°59'40.9"	E2°09'24.6"	Chr3	24	24	1	6.13	0.69	-0.0 08
Centre	N46°50'28.1"	E1°44'16.3"	Cht2	24	24	1	5.50	0.64	-0.00 8
Centre	N46°50'18.2"	E1°43'52.4"	Cht3	24	24	1	5.88	0.65	-0.00 9
Centre	N47°01'34.1"	E2°17'44.1"	Flo1	23	23	1	6.63	0.68	-0.01 5
Centre	N46°59'45.8"	E2°16'05.5"	Flo3	24	24	1	5.63	0.64	0.016
Centre	N46°59'19.2"	E2°13'17.2"	Flo4	24	24	1	6.63	0.67	0.038
Centre	N46°56'17.8"	E1°58'03.1"	Iss2	24	24	1	6.13	0.66	0.018
Centre	N46°55'38.2"	E1°56'27.6"	Iss3	24	23	0.96	5.63	0.62	0. 01
Centre	N47°47'18.0"	E1°08'56.0"	Sel13	24	24	1	4.88	0.62	0.03 1
Centre	N47°42'57.0"	E1°15'15.0"	Sel18	24	24	1	5.75	0.65	0.00 4

population, gene diversity will be higher than expected at equilibrium due to the increase in frequency of rare alleles (Cornuet & Luikart, 1996). The computed distribution of heterozygosity expected enables the computation of a  $P$ -value for the observed heterozygosity. Gene diversity was estimated under the three available models, the stepwise mutation model (SMM), the infinite allele model (IAM), and the two-phase model (TPM) of Rienzo *et al.* (1994), which may be closer to the true model of mutation for most microsatellite loci. The proportion of alleles attributed to SMM under the TPM was 70%, with a variance of 30. Estimations were based on 1000 replications. The Wilcoxon sign-rank test (Luikart *et al.*, 1997) was performed to determine whether the allele frequency distribution deviates significantly from expected under mutation-drift equilibrium.

### 3. Results

#### *Genetic diversity within populations*

Over the 29 sampled populations, the number of alleles at each locus ranged from 3 (*MinLm4*) to 21 (*MinLm632*). Average gene diversity across all field populations ranged from 0.05 (*MinLm4*) to 0.87 (*MinLm2*). Locus *MinLm4* only had three different alleles with one allele found in 97% of the overall isolates (Table 4.3). Allelic richness ( $N_{all}$ ) was moderately high ( $5.88 \pm 0.45$ , mean  $\pm$  SD), ranging from 4.88 to 7 in the Sel13 (Region Centre) and THE (Region Brittany) field populations respectively. Gene diversity  $H$  over the eight loci was high and homogeneous for the 29 field populations, ranging from 0.62 to 0.70 (Table 4.4). Among the 693 isolates analysed, 687 multilocus haplotypes were obtained with the eight minisatellite loci. Three identical genotypes were found twice in the same field population (Con2, Iss3, VER) and three others identical genotypes were shared between two distant field populations (VER-Con2, GER-CHL, Cht3-EAN) separated by a maximum of 250 km. Numbers of genotypes equalled numbers of isolates in 26 field populations (Table 4.4), and as a result genotypic richness ( $R$ ) was high in all field populations (0.96 to 1).

#### *Linkage disequilibrium*

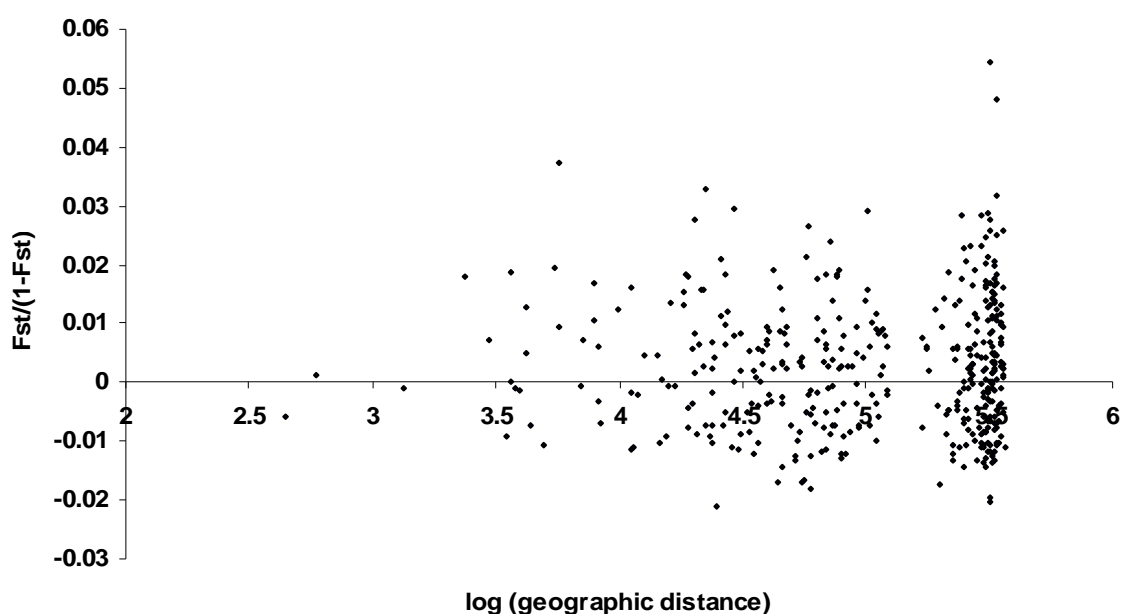
Linkage disequilibrium was tested with the eight minisatellite loci. Seventeen field populations showed random association of all alleles at all loci. A non-significant linkage disequilibrium among alleles of locus pairs was found in 801 of the 812 pair-wise comparisons (98.6%) suggesting random mating. The index of multilocus linkage disequilibrium was low and not significant in all field populations, ranging from  $r_d = -0.019$  to 0.041, with the null hypothesis of random mating accepted for all field populations (Table

**Table 4.5:** Analysis of molecular variance (AMOVA) for *Leptosphaeria maculans* field populations from the two French regions

Source of variation	df	Variance components	% of variation	P
Among regions	1	0.002	0.06	0.22 <sup>a</sup>
Among populations	27	0.07	2.56	0.14 <sup>a</sup>
Within populations	1259	2.62	97.38	0.10 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Probability of having values larger than those observed based on 5,000 randomizations of the treatments

<sup>b</sup> Probability of having value lower than observed based on 5,000 randomizations of the treatments



**Figure 4.3:** Multilocus estimates ( $\theta$ ) of genetic differentiation  $F_{ST}$  expressed as  $F_{ST}/(1 - F_{ST})$  are plotted against logarithm of geographic distance (km) for each pair of *Leptosphaeria maculans* field populations.

4.4). When the complete data set was analysed as a single group, none of the locus pairwise comparisons showed linkage disequilibrium.

#### *Genetic diversity among populations*

Hierarchical AMOVA revealed that ca. 97% of the genetic variability was distributed within field populations. Only 2.56% of the total variance was distributed among field populations from a region, and 0.06% of the genetic variability was distributed among the regions (Table 4.5). These results were consistent with the estimates of a low genetic differentiation between field populations through  $F_{ST}$  analyses. Unbiased estimators  $\theta$  of  $F_{ST}$  ranged from -0.02 to 0.05 for each pairwise comparison of field populations with an average value of  $F_{ST}$  of 0.003. None of the pairwise comparisons between field populations showed significant genetic differentiation ( $P < 0.05$ ).  $F_{ST}$  maximal value (0.05) was reached for the comparison between field populations named Iss3 and Ver1 geographically separated by 318 km and sampled in the two French regions studied. Nevertheless no significant correlation was found between logarithmic geographic distances and Rousset's genetic distance  $F_{ST} / (1 - F_{ST})$  (Figure 4.3) neither over all field populations nor at the regional scale. At these scales these results do not support the isolation-by-distance relationship, i.e. an increase in genetic distance with increasing geographic distance between field populations.

#### *Effective population size fluctuations*

Comparisons between observed heterozygosity and expected heterozygosity revealed significant (Wilcoxon sign-rank test,  $P < 0.05$ ) gene diversity excess for 20 of the 29 field populations under the TPM model (Table 4.6). Under the IAM model, all field populations showed significant excess in gene diversity ( $P < 0.05$ ). Conversely, under the SMM model, none of the field populations displayed significant gene diversity excess ( $P > 0.05$ ). For the three models, no differences were found among the two French regions.

## **4. Discussion**

All the French field populations of *L. maculans* had high levels of genetic diversity, indicated by the high levels of gene and genotypic diversities. These results are consistent with those from previous studies of field populations in Canada (Mahuku *et al.*, 1997) and Australia (Barrins *et al.*, 2004; Hayden *et al.*, 2007), and with results from a previous study conducted in France (Gout *et al.*, 2006). Here we confirmed the high genetic diversity of

**Table 4.6:** Gene diversity (H) in each field population tested with Wilcoxon sign-rank test under three models: IAM, TPM (with 70% of alleles attributed to SMM) and SMM. *P* values after 1000 simulation replicates are presented.

Region	Population	Wilcoxon sign-rank test Probability for H excess ( <i>P</i> values)		
		IAM	TPM	SMM
Brittany	ARM	0.006	0.014	0.191
Brittany	Bre1	0.004	0.004	0.148
Brittany	Bre4	0.010	0.098	0.629
Brittany	CHL	0.020	0.037	0.770
Brittany	COG	0.010	0.037	0.371
Brittany	Con1	0.004	0.014	0.156
Brittany	Con2	0.004	0.012	0.406
Brittany	EAN	0.010	0.037	0.578
Brittany	FEI	0.037	0.230	0.844
Brittany	GER	0.010	0.156	0.320
Brittany	Ler	0.004	0.008	0.234
Brittany	MSM	0.014	0.098	0.629
Brittany	Pai3	0.010	0.098	0.527
Brittany	THE	0.004	0.020	0.594
Brittany	Thu1	0.010	0.037	0.422
Brittany	VER	0.004	0.008	0.148
Brittany	Ver1	0.004	0.004	0.289
Centre	Bou1	0.004	0.027	0.098
Centre	Chr1	0.004	0.039	0.594
Centre	Chr3	0.014	0.098	0.527
Centre	Cht2	0.004	0.020	0.406
Centre	Cht3	0.004	0.020	0.766
Centre	Flo1	0.014	0.273	0.680
Centre	Flo3	0.008	0.039	0.406
Centre	Flo4	0.014	0.098	0.770
Centre	Iss2	0.010	0.027	0.473
Centre	Iss3	0.039	0.234	0.711
Centre	Sel13	0.004	0.008	0.289
Centre	Sel18	0.004	0.008	0.148

French field populations of *L. maculans* both with greater numbers of genetic markers and field populations, and on a spatial scale including two regions differing by their oilseed rape growing areas. The set of eight very polymorphic minisatellite loci allowed us to discriminate most of the isolates. This very high genotypic diversity associated with the absence of linkage disequilibrium, supported by the even distribution of mating types (data not shown) in all field populations, suggested the importance of sexual reproduction in the life cycle of *L. maculans* in France. The major role of sexual reproduction in the epidemiology of the disease was already documented (Hall, 1992; West *et al.*, 2001), as ascospores are considered the main source of primary infections. High and constant levels of genetic diversity and allelic richness in all field populations are in agreement with the hypothesis that field populations of *L. maculans* operate as one panmictic population with frequent sexual reproduction in France, with large effective population sizes in these populations, even during the saprophytic stage on oilseed rape stubble. The occurrence of three genotypes detected twice in the same field questions the role of asexual reproduction during epidemics, but distances maintained between sampled plants were larger than conidia dispersal distances. The occurrence of three genotypes detected twice in distant fields might illustrate the possibility of gene flow through human transport.

We documented the absence of spatial genetic structure in French field populations of *L. maculans*. Genetic differentiation among populations was low and no  $F_{ST}$  pair-wise comparisons were significant whatever the geographic distance separating the populations. We could not detect a significant isolation by distance pattern among populations through the Rousset's method and the regression between the  $F_{ST} / (1-F_{ST})$  and the log-transformed geographic distances. The detection of isolation by distance pattern strongly depends on the spatial scale studied (Rousset, 1997) and our preliminary knowledge of ascospore dispersal distances allowed us to optimise our sampling scheme. This genetic homogeneity among populations suggests important gene flow at the spatial scale studied and let think ascospore dispersal may reach distances greater than previously expected. Another explanation is that disease spread could also result from the human transport of infected seeds (Brown & Hovmoller, 2002). These longer dispersal events via human transport, and so larger migration rates, tend to reduce genetic differentiation through selection and genetic drift between isolated populations (Slatkin, 1987) and were previously suggested in the worldwide spread of the black leaf streak fungus of bananas *Mycosphaerella fijiensis* (Rivas *et al.*, 2004), the wheat leaf blotch fungus *M. graminicola* (Linde *et al.*, 2002) or the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina* (Barrès *et al.*, 2008). The human transport of oilseed rape seeds infected by *L. maculans* might explain the rapid spread of disease observed in France. The undetected isolation by distance pattern could also be due an absence of genetic



equilibrium. Recurrent colonisations of fields at each season resulted in a limited number of migrating spores could create this non-equilibrium. Nevertheless the high levels of gene and genotypic diversities found in all field populations do not support this hypothesis and suggest *L. maculans* field populations do not undergo loss of genetic diversity by genetic drift during their saprophytic stage on oilseed rape stubble between growing seasons. Hence bottlenecks are not likely to occur during intercropping. Yet, the absence of significant genetic drift may give evidence for large effective population sizes ( $N_e$ ) in *L. maculans* populations.  $N_e$  has a large influence on overall levels of genetic diversity and buffers the effects of genetic drift (Nadler, 1995; Criscione *et al.*, 2005), limiting the chance to detect IBD pattern. Since  $N_e$  affects local adaptive potential as the ability to evolve host resistance, it is necessary to reduce  $N_e$  in *L. maculans* field populations. This is performed through crop management practices between growing seasons, such as oilseed rape stubble burial by ploughing, practices reducing population sizes and therefore amplifying loss of genetic diversity through genetic drift. These practices are very important considering the great set of potential *Brassica* weed hosts for *L. maculans*. The fungus has been reported from a wide range of weed *Brassica* hosts: *B. alba*, *B. arvensis*, *B. campestris*, *B. kaber*, *B. tournefortii*, *Raphanus raphanistrum*, *Sinapsis arvensis*, *Thlapsi arvense* and *Sisymbrium* sp. (Gabrielson, 1983), which may constitute another way for the fungus to maintain relatively large  $N_e$  in natural populations and could also act as an inoculum pool to initiate epidemics.

The AMOVA analysis revealed that most of the genetic diversity (97.4 %) is present within field population, confirming results from French and Australian studies (Barrins *et al.*, 2004; Gout *et al.*, 2006). Although the two regions studied differ greatly for oilseed rape growing surfaces, the percentage of the genetic variability distributed among the two regions was very low. Levels and spatial distribution of genetic diversity did not differ among the two regions sampled. These results suggest either high gene flow among the two regions or those populations from Region Brittany result from the colonisation of a diverse genetic pool consisting of a great number of individuals. In comparison to gene diversity expected under genetic equilibrium, gene diversity deficiency at neutral loci is expected in these expanding populations (Cornuet & Luikart, 1996). With the tests performed, results depended strongly on the mutation model employed for the analysis, and with the strict SMM model, the most conservative for testing heterozygosity excess caused by bottlenecks (Cornuet & Luikart, 1996), none of the populations showed significant recent size changes. With the two other mutation models (IAM and TPM) results illustrated a trend to gene diversities excess in field populations whatever the region they come from, suggesting recent bottlenecks signatures. The increasing oilseed rape growing surfaces in Brittany should lead to a matching expansion of disease in this region but recent increases in effective population sizes in





Brittany were not shown. The test only allows the detection of recent historical size fluctuations and relies on the assumption that populations do not receive migrants. Disease spread in Brittany may be too old for its detection with this test. Departures from model assumptions (no immigration) could hinder the detection of recent demographic increases, or the number of loci may be not sufficient to make tests with high statistical power.

This population genetic study supports high dispersal rates between *L. maculans* populations in France. In agreement with previous studies, this work highlights the high genetic diversity in all populations and the small spatial scale on which this diversity is present. *L. maculans* populations seem to present large effective population sizes maintaining high levels of gene and genotypic diversities; bottlenecks are likely to be minor during the fungus saprophyte stage on oilseed rape stubble. Also random mating appears to be a preponderant and regular mechanism in *L. maculans* life cycle in France, where populations act as a single panmictic unit. All these components confer a high evolutionary potential to *L. maculans* according to the plant pathogen classification proposed by McDonald & Linde (2002). As a result, two major resistance genes (*Rlm*) in *Brassica napus* have recently been overcome in France (*Rlm1* introduced into several winter cultivars) and Australia (resistance from *Brassica rapa* var. *sylvestris* introduced into cv. Surpass 400) within three years of their commercial deployment (Li & Sivasithamparam, 2003; Rouxel *et al.*, 2003; Sprague *et al.*, 2006). Disease control strategies aiming either at the prevention of virulent spore dispersal from resistant crops to new resistant crops through spatial cultivar deployment; or at the reduction of pathogen population size during intercropping or at the limitation of sexual reproduction via oilseed rape stubble management are essential to preserve effectiveness of the limited number of specific resistance genes to *L. maculans* in *B. napus*.

## References

- Agapow P-M, Burt A, 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* **1**, 101-102.
- Ansan-Melayah D, Balesdent MH, Delourme R, Pilet ML, Tanguy X, Renard M, Rouxel T, 1998. Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. *Plant Breeding* **117**, 373-378.
- Aubertot JN, West JS, Bousset-Vaslin L, Salam MU, Barbetti MJ, Diggle AJ, 2006. Improved resistance management for durable disease control: a case study of phoma stem



- canker of oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 91-106.
- Aylor D, 1990. The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 73-92.
- Barrès B, Halkett F, Dutech C, Andrieux A, Frey P, 2008. Genetic structure of the poplar rust fungus *Melampsora larici-populina*: evidence for isolation by distance in Europe and recent founder effects overseas. *Infection, Genetics and Evolution*.
- Barrins JM, Ades PK, Salisbury PA, Howlett BJ, 2004. Genetic diversity of Australian isolates of *Leptosphaeria maculans*, the fungus that causes blackleg of canola (*Brassica napus*). *Australasian Plant Pathology* **33**, 529-536.
- Brown JK, Hovmoller MS, 2002. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* **297**, 537-41.
- Burnett J, 2003. Fungal populations and species. New York, Oxford University Press.
- Cornuet JM, Luikart G, 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Criscione CD, Poulin R, Blouin MS, 2005. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and microevolutionary processes. *Molecular Ecology* **14**, 2247-2257.
- Delourme R, Chevre AM, Brun H, Rouxel T, Balesdent MH, Dias JS, Salisbury PA, Renard M, Rimmer SR, 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 41-52.
- Dorken ME, Eckert CG, 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology* **89**, 339-350.
- Eckert M, Gout L, Rouxel T, Blaise F, Jedryczka M, Fitt B, Balesdent MH, 2005. Identification and characterization of polymorphic minisatellites in the phytopathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* **47**, 37-48.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2006). Arlequin, version 3.1: an integrated software package for population genetics. Computational and Molecular Population Genetics Lab, Institute of Zoology, University of Berne, Switzerland.
- Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR, 2006. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 3-15.
- Gabrielson RL, 1983. Blackleg disease of crucifers caused by *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) and its control. *Seed Science and Technology* **11**, 749-780.
- Gandon S, Capowiez Y, Dubois Y, Michalakis Y, Olivieri I, 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society of London B* **263**, 1003-1009.



- Goudet J, 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* **86**, 485-486.
- Gout L, Eckert M, Rouxel T, Balesdent MH, 2006. Genetic variability and distribution of mating type alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* from France. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 185-191.
- Gregory PH, 1973. Microbiology of the atmosphere. Aylesbury, Leonard Hill.
- Hall R, 1992. Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 46-55.
- Hammond KE, Lewis BG, 1986. The timing and sequence of events leading to stem canker disease in populations of *Brassica napus* var. *oleifera* in the field. *Plant Pathology* **35**, 551-564.
- Hardy OJ, Vekemans X, 2002. spagedi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* **2**, 618-620.
- Hayden HL, Cozijnsen AJ, Howlett B, 2007. Microsatellite and minisatellite analysis of *Leptosphaeria maculans* in Australia reveals regional genetic differentiation. *Phytopathology* **97**, 879-887.
- Jeger MJ, 1999. Improved understanding of dispersal in crop pest and disease management: current status and future directions. *Agricultural and Forest Meteorology* **97**, 331-349.
- Kaltz O, Shykoff JA, 1998. Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity* **81**, 361-370.
- Li H, Sivasithamparam K, 2003. Breakdown of a *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* single dominant blackleg resistance gene in *B. napus* rapeseed by *Leptosphaeria maculans* field isolates in Australia. *Plant Disease* **87**, 752.
- Linde CC, Zhan J, McDonald BA, 2002. Population structure of *Mycosphaerella graminicola*: from lesions to continents. *Phytopathology* **92**, 946-955.
- Luikart G, Painter J, Crozier RH, Westerman M, Sherwin WB, 1997. Characterization of microsatellite loci in the endangered long-footed potoroo *Potorous longipes*. *Molecular Ecology* **6**, 497-8.
- Mahuku GS, Goodwin PH, Hall R, Hsiang T, 1997. Variability in the highly virulent type of *Leptosphaeria maculans* within and between oilseed rape fields. *Canadian Journal of Botany* **75**, 1485-1492.
- Manel S, Gaggiotti OE, Waples RS, 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution* **20**, 136-42.
- Marcroft SJ, Sprague SJ, Plymer SJ, Salisbury PA, Howlett BJ, 2004. Crop isolation, not extended rotation length, reduces blackleg (*Leptosphaeria maculans*) severity of canola (*Brassica napus*) in south-eastern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **44**, 601-606.



- McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349-79.
- McDonald BA, Zhan J, Burdon JJ, 1999. Genetic structure of *Rhynchosporium secalis* in Australia. *Phytopathology* **89**, 639-645.
- McGee DC, 1977. Black leg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) of rapeseed in Victoria : sources of infection and relationships between inoculum, environmental factors and disease severity. *Australian Journal of Agricultural Research* **28**, 53-62.
- Nadler S, 1995. Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *Journal of Parasitology* **81**, 395-403.
- Nathan R, Perry G, Cronin JT, Strand AE, Cain ML, 2003. Methods for estimating long-distance dispersal. *Oikos* **103**, 261-273.
- Nei M, 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New-York, Columbia University Press.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM, 1999. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity* **90**, 502-503.
- Purwantara A, Barrins JM, Cozijnsen AJ, Ades PK, Howlett BJ, 2000. Genetic diversity of isolates of the *Leptosphaeria maculans* species complex from Australia, Europe and North America using amplified length polymorphism analysis. *Mycological Research* **104**, 772-781.
- Raymond M, Rousset F, 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Rienzo AD, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB, 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 3166-3170.
- Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Rousset F, 2000. Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 58-62.
- Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, Balesdent MH, 2003. A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 871-881.
- Salam MU, Galloway J, Khangura R, Diggle AJ, MacLeod WJ, Barbetti MJ, 2001. Spatial spread of blackleg in canola - a regional scale simulation model. Proceedings of the 12th Australian research assembly on Brassicas.
- Slatkin M, 1987. Gene flow and the geographical structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.





- Sprague SJ, Balesdent MH, Brun H, Hayden HL, Marcroft SJ, Pinochet X, Rouxel T, Howlett B, 2006. Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European Journal of Plant Pathology* **114**, 33-40.
- Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL, 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**, 10-27.
- Wright S, 1943. Isolation by Distance. *Genetics* **28**, 114-38.
- Zaffarano PL, McDonald BA, Zala M, Linde CC, 2006. Global hierarchical gene diversity analysis suggests the Fertile Crescent is not the center of origin of the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology* **96**, 941-950.



## Discussion générale

L'établissement de stratégies de gestion des cultures maintenant les populations d'agents pathogènes sous un seuil de nuisibilité économique repose sur la connaissance précise des caractéristiques génétiques et épidémiologiques des pathosystèmes concernés. Cette thèse aborde l'épidémiologie et la génétique des populations au sein du pathosystème *L. maculans* / *B. napus*. Nous avons acquis des connaissances sur les mécanismes épidémiologiques relatifs à la reproduction sexuée de l'agent pathogène, et nous allons maintenant discuter des apports de ces connaissances à la définition de stratégies de gestion durable des résistances variétales du colza ; cette gestion vise à maintenir les populations d'agents pathogènes virulents sous un seuil ne leur permettant pas de s'adapter à ces résistances variétales. Bien que chaque pathosystème possède ses caractéristiques biologiques propres, la majorité des éléments apportés dans cette discussion pourront être extrapolés vers d'autres pathosystèmes faisant intervenir une plante hôte annuelle et un agent pathogène fongique à reproduction sexuée quasi-obligatoire durant son cycle épidémique et possédant des caractéristiques biologiques proches.

Les méthodes de lutte contre les maladies des cultures consistent à limiter le développement épidémique en se basant sur les concepts initialement formulés par Van der Plank (1960). Le développement épidémique dépend de la taille de la population initiale d'inoculum et du taux d'accroissement de la maladie. L'éradication complète de l'inoculum n'étant possible que dans de très rares cas, il faut donc retarder le développement épidémique (Cook & Yarham, 2006). L'emploi de variétés pourvues d'une résistance spécifique permet de réduire la taille initiale de la population, alors que l'emploi de variétés pourvues de résistance partielle permet de réduire le taux d'accroissement de la maladie. Cependant, les résistances ne sont efficaces que jusqu'à leur contournement. Pour une gestion optimale des variétés résistantes, il est donc primordial d'agir sur la dynamique des populations pathogènes virulentes dès leur apparition, c'est-à-dire d'exercer des pressions sur ces populations qui en modifieront leur taille et leur structure (Shaw, 2006).

Les objectifs de ce travail de thèse se plaçaient à deux échelles spatiales. Il s'agissait d'abord d'examiner deux mécanismes épidémiologiques conditionnant l'accès des individus au site de la reproduction sexuée chez *L. maculans*. Le premier mécanisme correspond à la dispersion des pycnidiospores, seul moyen de transport (passif) pouvant permettre le rapprochement d'individus de types sexuels compatibles sur une même plante lorsque ces individus sont initialement distants. Les caractéristiques de la dispersion par la pluie des pycnidiospores ont été élucidées dans ce travail. Le second mécanisme permettant l'accès



au site de la reproduction sexuée est la colonisation systémique de la tige de colza par des individus de types sexuels compatibles à partir des infections foliaires ou cotylédonaire. Nous avons examiné ce mécanisme et mis en évidence une possible régulation de la réussite de la progression systémique par les effectifs présents au niveau cotylédonaire. Après s'être intéressés à ces mécanismes favorisant ou défavorisant la reproduction sexuée chez *L. maculans* à l'échelle de la plante voire d'un groupe de plantes, nous voulions déterminer l'échelle spatiale, certainement beaucoup plus vaste, à laquelle les ascospores issues de la reproduction sexuée étaient dispersées. Nous avons utilisé une méthode indirecte d'estimation de distance de dispersion, encore peu développée chez les champignons. Cette approche nous a permis d'observer la grande diversité génétique des populations françaises de *L. maculans*, et de confirmer l'importance de la reproduction sexuée dans ces populations, mais compte-tenu de l'absence de différenciation génétique entre les populations étudiées, il n'a pas été possible d'obtenir d'estimations de la distance de dispersion des ascospores.

Les paragraphes suivants décrivent plus précisément les résultats obtenus dans chacune des trois parties de cette thèse. Ces résultats sont discutés au regard des pratiques culturales qui influenceraient la dynamique des populations pathogènes virulentes émergentes en accentuant ou modérant les forces évolutives en jeu à chaque étape du cycle épidémique.

### **Dispersion par la pluie des pycnidiospores de *L. maculans***

Comme tous les champignons phytopathogènes hétérothalliques stricts, la reproduction sexuée chez *L. maculans* nécessite la rencontre de mycéliums de types sexuels compatibles sur une même plante. Chez ces champignons il n'existe pas de mécanismes actifs de recherche des partenaires de la reproduction sexuée ; cette rencontre est conditionnée par le transport passif des spores issues de la reproduction asexuée (pycnidiospores) du champignon conduisant à leur présence sur une même plante. Lorsque la population pathogène est de grande taille, il est vraisemblable que la présence de partenaires pour la reproduction sexuée sur une même plante ne soit pas un facteur limitant. Dans ces populations de grande taille chez *L. maculans*, le rôle des pycnidiospores est d'ailleurs souvent négligé, ayant une influence sur les dégâts occasionnés en fin d'épidémie bien moindre que celle des infections primaires causées par les ascospores (Hall, 1992). En revanche, dans la phase initiale du contournement d'une résistance spécifique, la fréquence de la virulence correspondante est faible dans la population pathogène, les densités d'individus sur les variétés résistantes sont faibles, la rencontre de partenaires pour la



reproduction sexuée peut être difficile (effet Allee). Il devient alors primordial de connaître en détail le mécanisme de transport passif des spores issues de multiplication asexuée.

Nous avons montré que les pycnidiospores de *L. maculans* sont dispersées par le mécanisme de *splashing*, c'est-à-dire transportées dans les gouttelettes d'éclaboussure résultant de l'impact d'une goutte incidente de pluie sur une surface (feuille ou résidu de tige de colza) porteuse de pycnides (fructifications asexuées) (Madden, 1992). Nous avons quantifié ces distances de dispersion en conditions contrôlées et montré que les pycnidiospores sont dispersées à courte distance de la source de spores : 90% des spores sont transportées dans les 14 cm autour de la source de spores constituée d'une macule foliaire. Ces distances de dispersion par *splashing* obtenues en conditions contrôlées sont similaires à celles obtenues pour d'autres champignons phytopathogènes, par exemple *Pseudocercospora capsellae* (Fitt *et al.*, 1992), *Pyrenopeziza brassicae* (Fitt *et al.*, 1987), *Fusarium culmorum* et *F. avenaceum* (Jenkinson & Parry, 1994). En précisant ce mécanisme, nous avons montré qu'il pouvait se révéler très efficace pour permettre l'apparition de nouveaux sites infectieux à partir d'un site initial, et que, sous réserve de la réalisation de cycles secondaires au champ, il pouvait ainsi participer activement au taux d'accroissement de la population pathogène. Ceci est renforcé par les premiers résultats de l'expérimentation complémentaire effectuée en conditions de plein champ, qui révèlent des distances de dispersion des pycnidiospores plus élevées, atteignant régulièrement l'ordre du mètre. Ces résultats confirment des études antérieures révélant la progression de la maladie au cours d'une saison par l'intermédiaire des pycnidiospores jusqu'à 105 cm à partir de rangs inoculés (Barbetti, 1976), ou bien jusqu'à 216 cm à partir de rangs issus de semences contaminées (Hall *et al.*, 1996). Au champ les distances de dispersion des pycnidiospores plus grandes s'expliquent par la succession de plusieurs cycles secondaires au cours de la saison ainsi que par l'action du vent, qui augmente les distances de dispersion des gouttelettes d'éclaboussure contenant les pycnidiospores.

Ces résultats suggèrent que la dispersion par la pluie des pycnidiospores de *L. maculans* peut faciliter la rencontre sur une même plante de souches de types sexuels compatibles initialement faiblement distantes. Les cycles secondaires de la maladie faisant intervenir les pycnidiospores pourraient ainsi être cruciaux dans les populations du champignon de petite taille (populations virulentes fondatrices) pour permettre au champignon d'avoir accès à la reproduction sexuée afin de transmettre des descendants entre saisons culturales. Toutefois l'efficacité de ces cycles secondaires est limitée par les stades de sensibilité du colza d'hiver en France. Seules les infections se produisant avant le stade 6 feuilles contribuent de manière significative aux nécroses sévères du collet (Brunin & Lacoste, 1970), site de la





reproduction sexuée. Ainsi seuls les cycles secondaires précoces au cours de la saison de culture devraient favoriser la rencontre de souches de types sexuels compatibles au collet des plantes de colza. Il faudrait cependant reconsidérer ces résultats pour étudier si des infections plus tardives peuvent ou non permettre la progression systémique du champignon et sa reproduction sexuée, même sans causer de pertes sévères à la culture. La contribution des infections foliaires tardives (fin décembre) au développement final des nécroses au collet a d'ailleurs été postulée sous certaines conditions environnementales en France (Brun *et al.*, 2000).

Les semis précoces du colza pourraient permettre de désynchroniser les premiers cycles secondaires des stades particulièrement sensibles du colza. Les semis précoces permettent d'ailleurs aussi de limiter le nombre d'infections primaires par les ascospores sur les premières feuilles sensibles influençant le développement final de nécroses au collet (Hammond & Lewis, 1986; Poisson & Perès, 1999). Il semble également possible que les densités de semis du colza puissent moduler les surfaces foliaires susceptibles de recevoir des pycnidiospores dispersées par la pluie : en diminuant les densités de semis, la surface recouverte par les feuilles des jeunes plantules diminue sur une parcelle et les surfaces de sols nus augmentent ; ainsi la probabilité d'interception des pycnidiospores issues des macules causées par les infections primaires par les surfaces foliaires diminue d'autant que les pycnidiospores sont dispersées sur de courtes distances. Néanmoins les densités de semis influencent également la croissance des plantes : de fortes densités de semis produisent des plantes avec de longs pétioles et des feuilles basses dans le couvert qui ont tendance à tomber rapidement. Les fortes densités de semis peuvent ainsi permettre d'échapper à la maladie car les feuilles tombent avant la colonisation systémique du pétiole, ou de retarder la colonisation complète des pétioles plus longs. Par ailleurs, les fortes densités de semis ont tendance à produire des plantes grandes et fines plus sensibles à la verse (Aubertot *et al.*, 2006). Inversement, le colza possède une forte capacité de compensation et à faibles densités de semis les bénéfices apportés par l'espacement entre plantes, et donc l'augmentation de la surface de sol nu susceptible de recevoir les pycnidiospores contenues dans les gouttelettes d'éclaboussure, peuvent être compensés par un plus grand développement de chacune des plantes. Dans ce cas, la dispersion va permettre à chaque plante de collecter plus d'individus, alors que ces individus se seraient retrouvés sur des plantes distinctes dans le cas de semis à forte densité.

Ce mécanisme de dispersion par la pluie des pycnidiospores de *L. maculans* est démontré et très efficace puisque la libération et le transport des pycnidiospores se produit dès l'impact d'une seule goutte incidente, des pycnidiospores sont toujours libérées à partir de macules



foliaires après les impacts successifs de 140 gouttes incidentes, et la gouttelette d'éclaboussure constitue l'unité de dissémination de la maladie. Nous soulignons ainsi l'importance de ce mécanisme à la fois pour l'expansion de la maladie dans l'espace, qui permet la rencontre des partenaires de la reproduction sexuée, mais aussi pour l'augmentation de la taille de la population pathogène de manière clonale. La taille de la population est déterminante dans l'évolution des agents pathogènes : le nombre de mutations est d'autant plus grand que la taille de la population est grande, alors que l'effet de la dérive génétique est limité par rapport à de petites populations (McDonald & Linde, 2002; Aubertot *et al.*, 2006). Les cycles secondaires de la maladie pourraient aussi favoriser la persistance de populations de *L. maculans* de petite taille apparues sur des parcelles de colza où une variété portant un gène majeur de résistance serait cultivée en augmentant le nombre de plantes infectées et ainsi le nombre de tiges colonisées par *L. maculans* où il peut survivre de manière saprophyte sous forme de mycélium même en l'absence de reproduction sexuée.

Pour limiter l'expansion spatiale et la croissance de la population par cycles secondaires, il est possible d'employer des fongicides ou des mélanges variétaux. Les fongicides permettent de diminuer le nombre de macules foliaires et permettent de retarder l'apparition de nouvelles macules (West *et al.*, 2002). Toutefois les applications fongicides sont coûteuses et présentent une difficulté de positionnement même si des règles de décision ont été proposées en France et au Royaume Uni (Penaud *et al.*, 1999; West *et al.*, 2002). Les mélanges de variétés permettraient de limiter l'amplification de la taille de la population pathogène par cycles secondaires. Les distances de dispersion des pycnidiospores indiquées dans notre étude en conditions contrôlées suggèrent que les mélanges variétaux seraient efficaces si chaque variété était semée sur des rangs alternés, ainsi les rangs avoisinant le rang des premières infections seraient incompatibles s'ils différaient par leur gène majeur de résistance et pourraient constituer une barrière physique à la dispersion des pycnidiospores vers des rangs « compatibles » éloignés. D'après notre étude au champ, les distances de dispersion et donc l'efficacité de l'effet de barrière pourraient même être supérieurs. Des travaux sont en cours pour évaluer l'effet de mélanges variétaux sur l'adaptation des populations de *L. maculans* (Anne-Marie Chèvre, communication personnelle).

Nos résultats sous simulateur de pluie et dans des parcelles expérimentales soulignent également que des résidus de tige de colza porteurs de pycnides peuvent constituer une source alternative d'inoculum primaire pour amorcer les épidémies en provoquant l'apparition de foyers de macules autour de ces résidus. La transmission de descendants virulents entre saison culturales pourrait alors s'effectuer via la production de spores issues



de multiplication asexuée, sans nécessité de reproduction sexuée. Ceci constituerait un élément aggravant pour le contournement des résistances. Néanmoins des mesures peuvent être prises pour prévenir ce risque en s'assurant que ces résidus ne contribuent pas à fournir ces descendants virulents. Premièrement la survie du mycélium et la production des pycnidiospores sur résidus peuvent être réduites par le broyage et l'enfouissement des résidus (Turkington *et al.*, 2000) et par l'application de fongicides (Wherrett *et al.*, 2003). Deuxièmement la dispersion des descendants virulents issus de multiplication asexuée vers un nouvel hôte résistant peut être bloquée par les rotations culturales (pas de culture successive de la même variété dans la même parcelle ni dans des parcelles adjacentes).

Le dispositif expérimental original utilisé dans notre étude au champ a été rendu possible grâce à l'étude de Brun *et al.* (2000) qui a eu pour conséquence la non-diffusion commerciale du gène de résistance *Rlm6* par l'INRA détenteur de ce gène. Ce dispositif a permis de mettre en valeur le rôle potentiel des spores issues de multiplication asexuée sur l'initiation d'une épidémie de Phoma. D'une part, ce dispositif permet de contrôler la source d'inoculum apporté sur les parcelles en utilisant des résidus inoculés au laboratoire. D'autre part, il permet de s'affranchir des possibles contaminations par la population naturelle locale de *L. maculans* en utilisant une variété de colza portant le gène majeur *Rlm6* puisque l'étude de la population pathogène locale permet de confirmer la faible fréquence de la virulence correspondante dans les populations naturelles (Hortense Brun, communication personnelle). Ces précautions permettent de ne pas douter de la source d'inoculum utilisée contrairement aux études précédentes (Ghanbarnia & Fernando, 2007). De plus, l'inoculation des résidus par des individus connus permet la vérification que les macules foliaires apparues sont bel et bien dues aux individus apportés sur résidus puisque les prélèvements non destructifs des macules permettent d'identifier les souches après génotypage. Il est à noter que les individus utilisés sont issus de la population locale par sélection récurrente (Brun *et al.*, 2000) et que la destruction de tous les résidus de colza présents sur les parcelles en fin de saison permet d'éviter que ces individus virulents envahissent la population pathogène locale. Outre l'apport méthodologique de cette expérimentation et les premiers résultats obtenus, il reste à clarifier si la reproduction sexuée et la production d'ascospores en fin de saison de culture est possible à partir de ces parcelles où les infections primaires ont été causées par des pycnidiospores. Ceci sera réalisé cet été à l'issue de la saison culturale. Le cas échéant ce serait la première description au champ d'un rôle épidémique majeur pour les pycnidiospores de *L. maculans* en dehors de l'Australie et du Canada où les conditions de culture du colza (culture de printemps où les feuilles sont réceptives plus longtemps et donc lors d'un nombre de cycles



secondaires plus important) semblent plus propices à leur conférer une importance épidémiologique (Hall *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2007).

Les pycnidiospores de *L. maculans* pourraient donc influencer significativement la dynamique de ses populations virulentes de faible densité se développant sur des plantes de colza présentant un gène majeur de résistance nouvellement introduit dans des variétés commerciales. Le transport des pycnidiospores par les gouttelettes d'éclaboussures pourrait faciliter la rencontre d'individus de types sexuels compatibles sur une même plante, la multiplication asexuée de la maladie pourrait augmenter efficacement la taille de la population pathogène virulente, et les pycnidiospores pourraient constituer une source d'inoculum primaire entre deux saisons de culture sans que le recours à la reproduction sexuée soit nécessaire. Ces trois facteurs favoriseraient respectivement dans ces populations virulentes fondatrices la reproduction sexuée, les mutations tout en limitant les effets de la dérive génétique, la survie et la transmission de descendants entre saisons culturales. Néanmoins ces avantages évolutifs conférés par les pycnidiospores peuvent être contrecarrés en adoptant des pratiques culturales adaptées. C'est pourquoi pour préserver l'efficacité à long terme et sur une large échelle des gènes majeurs de résistance du colza, il est nécessaire de les associer à d'autres méthodes de lutte dès la mise en culture des variétés résistantes même lorsque le niveau de maladie semble bas. Parmi les pratiques culturales complémentaires, on peut citer le choix d'une date et densité de semis adaptées, les traitements fongicides foliaires, la culture de mélanges de variétés résistantes, le broyage et enfouissement des résidus et les traitements fongicides sur résidus.

### **Progression systémique de *L. maculans* des infections cotylédonaire au collet des plantes de colza**

La biologie particulière de *L. maculans* fait que la présence d'individus de types sexuels compatibles sur une même plante (feuilles, cotylédons) n'est pas une condition suffisante pour assurer l'occurrence de la reproduction sexuée et la formation de pseudothèces sur la tige de cette plante. La progression systémique de *L. maculans* à partir des infections foliaires et cotylédonaire jusqu'au collet est une étape obligatoire permettant l'accès au site de la reproduction sexuée. Nous nous étions proposé d'évaluer les effets du nombre de sites infectieux sur cotylédons, de la compétition entre souches et de la résistance polygénique de l'hôte sur la réussite de la colonisation systémique de la tige de colza. Ces objectifs ont été remplis.





Nous avons montré que la réussite de la colonisation systémique des tiges augmente avec le nombre de sites infectieux sur cotylédons, à la fois pour les plantes hôtes sensibles et avec résistance polygénique. Ce résultat souligne l'importance de limiter l'augmentation du nombre de macules par plante durant les stades sensibles comme nous l'évoquions précédemment. Une fois encore, en limitant la taille de la population pathogène sur une parcelle (notamment l'amplification du nombre de macules par cycles secondaires précoces) par des dates et densités de semis adaptées, par des traitements foliaires fongicides et par des mélanges de variétés résistantes, on diminuerait l'incidence des nécroses au collet et par là même l'accès au site de la reproduction sexuée pour le champignon.

Nos résultats révèlent aussi que des phénomènes de compétition entre individus peuvent se produire au cours du cheminement systémique du champignon des infections cotylédonaires jusqu'à l'hypocotyle. Ainsi la probabilité pour un individu d'atteindre l'hypocotyle dépend de sa densité relative sur cotylédons : plus la dose d'un individu compétiteur est importante, plus la probabilité pour le premier de coloniser l'hypocotyle est faible. Cette compétition intraspécifique, caractérisée ici par l'accès au site de la reproduction sexuée limité par un individu compétiteur, pourrait constituer une cause d'échec de la reproduction sexuée chez *L. maculans*. On peut parler ici de sélection densité-dépendante s'opérant sur la croissance mycélienne systémique. Ce type de sélection a été démontré expérimentalement chez d'autres champignons phytopathogènes tels les rouilles des céréales *Puccinia hordei* (Falahati-Rastegar *et al.*, 1981) et *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Newton *et al.*, 1997), par l'observation dans les deux cas de différences de taux de sporulation entre individus en fonction des densités relatives des individus.

Chez *L. maculans* cette compétition s'opérant durant la phase de colonisation systémique peut avoir des conséquences importantes sur la composition génétique des populations en limitant l'accès au site de la reproduction sexuée. Une étude au champ a révélé que des individus virulents *avrLm4* étaient moins performants que des individus avirulents *AvrLm4* durant la colonisation systémique à l'intérieur des pétioles du colza jusqu'à la tige, suggérant ainsi une pénalité adaptative suite à l'acquisition de la virulence (Huang *et al.*, 2006). Les individus virulents seraient dans ce cas moins susceptibles de transmettre des descendants par voie sexuée que des individus avirulents sur une variété sensible, ce qui pourrait limiter l'augmentation en fréquence de cette virulence dans la population pathogène régionale.

En revanche sur des hôtes résistants durant la phase initiale de contournement d'une résistance spécifique, la compétition intraspécifique entre individus virulents ne peut s'opérer qu'entre individus différant par d'autres caractères que la virulence correspondante, comme par exemple des individus de types sexuels différents ou bien d'autres virulences non nécessaires sur la variété en question. Nos résultats laissent penser qu'un déséquilibre entre



les deux types sexuels sur feuilles ou cotylédons, du fait de la prépondérance de l'un des types sexuels, conduirait à la présence d'un seul type sexuel dans la tige, le minoritaire étant défavorisé dans sa colonisation systémique, et ainsi aboutirait à l'absence de reproduction sexuée. Ce déséquilibre entre types sexuels pourrait se produire dans le cas d'un inoculum initial issu de multiplication asexuée (survie asexuée sur résidus de culture décrite auparavant) engendrant des infections primaires agrégées. Dans les populations naturelles de *L. maculans*, ce déséquilibre entre types sexuels au collet d'une même plante en fin de saison de culture a parfois été mis en évidence (annexe systémie) (Schmit *et al.*, 2002) et démontre que la reproduction sexuée n'est pas systématique sur les tiges des plantes infectées.

L'échec de la reproduction sexuée dû à la compétition entre individus au cours de la colonisation systémique paraît vraisemblable en situation naturelle, notamment dans la phase initiale d'adaptation aux variétés présentant une résistance spécifique, mais nous ne disposons que de très peu de leviers d'action à part l'utilisation d'une résistance polygénique pour amplifier ce phénomène.

Nos expérimentations en conditions contrôlées ont mis en valeur l'efficacité d'une résistance polygénique pour réduire l'incidence et la sévérité des nécroses au collet, confirmant des études antérieures au champ (Delourme *et al.*, 2006). Les fréquences de colonisation de la tige sont significativement réduites sur ces variétés comparées à des variétés sensibles. Nos résultats confortent l'hypothèse selon laquelle les résistances polygéniques du colza s'opposeraient à la colonisation systémique de la tige par *L. maculans* et limiteraient par conséquent les événements de reproduction sexuée. Chez *L. maculans*, étant donné l'importance de la reproduction sexuée dans l'adaptation aux résistances spécifiques, les résistances polygéniques seraient un moyen de limiter efficacement la reproduction sexuée et donc la production sur les résidus de spores qui constitueront l'inoculum primaire des saisons suivantes. Ce résultat prend une signification encore plus grande dans le cadre du maintien des populations pathogènes virulentes sous un seuil autorisant l'efficacité durable de résistances spécifiques. En combinant dans une même variété des facteurs quantitatifs de résistance (QTL) avec un gène majeur de résistance, la durabilité de ce dernier devrait être renforcée du fait du moindre accès au site de la reproduction sexuée pour le champignon et ainsi de l'atténuation du nombre d'ascospores virulentes produites à partir de ces variétés. Les résultats obtenus par Brun *et al.* (2000 ; 2007) soutiennent cette hypothèse car ils montrent la plus grande durabilité du gène *Rlm10* et du gène *Rlm6* lorsqu'ils sont introduits dans un fonds génétique de colza à résistance quantitative (variété Darmor) qu'introduit (pour *Rlm6*) dans un fonds génétique sensible.



Les résistances quantitatives du colza sont supposées plus durables car elles n'exercent pas sur les populations pathogènes une pression de sélection aussi intense que les résistances spécifiques. Elles permettent l'infection par l'ensemble des individus de *L. maculans* et s'opposent à la colonisation systémique du champignon, composante de son agressivité. Cependant, l'utilisation prolongée de variétés avec des résistances quantitatives pourrait mener à leur érosion, c'est-à-dire à une diminution de leur efficacité par la sélection récurrente des souches les mieux adaptées : seuls les individus atteignant la tige de colza par voie systémique se reproduisent sexuellement et produisent des ascospores disséminées dans la population régionale. Ainsi l'utilisation de variétés combinant résistance spécifique et quantitative conduirait théoriquement à la sélection d'individus virulents à l'agressivité accrue. Peu de données illustrent ce phénomène, même si la moindre efficacité de variétés de colza avec résistance polygénique au cours des saisons culturales a été rapportée (Delourme *et al.*, 2006) ; une expérimentation pluriannuelle de sélection récurrente sur des lignées partiellement résistantes est en cours au Rheu (Hortense Brun, communication personnelle). La méthode développée dans nos travaux permettant l'expression de nécroses au collet à partir d'inoculations sur cotylédons pourrait être un outil intéressant pour évaluer les niveaux d'agressivité des individus de *L. maculans*, car couplée à un suivi pluriannuel des individus échantillonnés sur des variétés à résistance quantitative, l'évolution de l'agressivité des souches pourrait être évaluée.

L'ensemble de ces résultats indique qu'il est possible d'influencer la réussite de la colonisation systémique du colza par *L. maculans*, étape fondamentale du cycle de vie du champignon pour assurer l'accès au site de la reproduction sexuée. La limitation du nombre de macules sur les plantes aux stades précoces et l'implantation de variétés avec résistance polygénique réduiraient significativement la probabilité d'accès aux tiges et donc de reproduction sexuée du champignon. L'utilisation de résistances polygéniques présente un double avantage : elle réduit les pertes de rendement (la sévérité des nécroses au collet est atténuée) et elle limite la reproduction sexuée du champignon, permettant potentiellement d'augmenter la durabilité des résistances spécifiques combinées dans une même variété. Dans le contexte de populations virulentes fondatrices de faible densité, les résistances polygéniques réduiraient la production d'inoculum sexué susceptible de coloniser de nouvelles parcelles résistantes la saison suivante. Le suivi de l'évolution de l'agressivité des souches semble dans ce cas nécessaire à la bonne utilisation des résistances polygéniques.



### Dispersion des ascospores de *L. maculans*

Dans les populations fongiques à dispersion aérienne, une fois qu'une virulence est présente à faible fréquence, les individus la portant peuvent infecter un hôte résistant distant. La fréquence de la virulence dans la population pathogène peut alors augmenter rapidement car l'allèle est déjà présent. Les événements de migration à longue distance peuvent avoir une forte influence sur la dynamique des populations pathogènes et doivent nécessairement être pris en compte dans une stratégie de gestion des résistances variétales. La compréhension des mécanismes d'adaptation des populations de *L. maculans* aux résistances spécifiques du colza ne peut pas être raisonnée uniquement à l'échelle d'une parcelle ; il est nécessaire de penser la durabilité à l'échelle de la population pathogène régionale, c'est-à-dire au niveau d'un réseau de parcelles caractérisé par des échanges d'individus entre parcelles. Pour élaborer des stratégies de gestion des résistances variétales à cette échelle, il est indispensable de connaître les capacités de dispersion de l'agent pathogène. Nous nous étions proposé de déterminer l'échelle spatiale à laquelle les échanges d'ascospores entre parcelles étaient effectifs par une approche indirecte de génétique des populations, méthode nous permettant de surcroît d'évaluer la diversité génétique de populations françaises de *L. maculans*, diversité souvent révélatrice des capacités d'adaptation d'un organisme aux contraintes que lui impose l'environnement. Ces objectifs ont été en partie atteints.

Nos résultats révèlent une très forte diversité génotypique au sein de chacune des populations analysées. Dans chaque parcelle étudiée le nombre de génotypes correspond quasiment à l'identique au nombre de souches analysées. De plus les niveaux de déséquilibre de liaison dans chacune des populations sont très bas et les ratios des deux types sexuels sont globalement équilibrés. Ces résultats confirment le rôle prépondérant de la reproduction sexuée dans la structuration génétique des populations de *L. maculans* et appuient cette hypothèse déjà présentée dans une autre étude française (Gout *et al.*, 2006). La reproduction sexuée chez *L. maculans* est donc une composante essentielle du cycle épidémique. Les ascospores sont d'ailleurs considérées comme la principale source d'inoculum primaire (Hall, 1992). Les changements géniques par l'intermédiaire des éléments transposables et des mutations de type RIP associés à la méiose et donc à la reproduction sexuée pourraient expliquer les forts niveaux de diversité génétique retrouvés dans notre étude. La très forte diversité génotypique associée à de la recombinaison sexuée révèle un fort polymorphisme des populations de *L. maculans* et traduit ses fortes capacités d'adaptation aux variations environnementales telles les pressions de sélection imposées par le colza. Comme nous l'avons déjà souligné, il s'avère très important de tenter





d'empêcher la reproduction sexuée du champignon au travers de pratiques culturales, surtout pour les populations virulentes infectant les parcelles de variétés résistantes.

Nos résultats n'ont pas permis de mettre en évidence de structuration génétique spatiale des populations de *L. maculans* à l'échelle étudiée. Par conséquent, nous n'avons pas pu inférer des distances de dispersion des ascospores malgré une méthode indirecte de mesure robuste et standardisée employant ici un nombre de marqueurs moléculaires polymorphes conséquent et se plaçant à une échelle spatiale adéquate d'après les connaissances disponibles.

Cette absence de structuration géographique peut s'expliquer par des flux de gènes réguliers entre les populations étudiées puisque la migration d'un faible nombre d'individus par génération suffit à prévenir la différenciation génétique entre sous-populations (Slatkin, 1987). Nos connaissances *a priori* sur les capacités de dispersion de *L. maculans* comparées aux distances géographiques entre populations de notre étude ne sont pas incompatible avec cette hypothèse. Des événements de dispersion des ascospores à plus longue distance que celle attendue pourraient également intervenir en conditions naturelles. Les ascospores éjectées hors de la couche limite proche de la surface du sol peuvent être transportées vers des couches supérieures de l'atmosphère où les vents dominants sont capables de disperser les spores sur de plus longues distances (Gregory, 1973; Aylor, 1990). De plus le transport humain des graines de colza contaminées par *L. maculans* peut constituer un mode de dispersion efficace de la maladie sur des distances non limitées. Dans ce cas le champignon n'a pas besoin de recourir à la reproduction sexuée pour se disperser sur de longues distances puisqu'il peut survivre sous forme de mycélium sur graines. La combinaison des ces deux modes de transport à longue distance peut se révéler très efficace pour permettre la migration de *L. maculans* à longue distance et ainsi propager une virulence entre zones géographiques éloignées. L'utilisation de semences certifiées par les agriculteurs permettrait d'endiguer le transport humain de la maladie et pourrait permettre de limiter l'expansion spatiale d'une virulence vers des zones de culture de variétés résistantes de colza.

Une seconde hypothèse permettant d'expliquer l'absence de différenciation génétique entre populations de *L. maculans* est le maintien de grandes tailles efficaces de populations entre les saisons de culture du colza. Ces grandes tailles de populations empêchent des effets significatifs de la dérive génétique (Wright, 1969) et assurent le maintien d'une grande diversité génétique dans les populations. Le maintien de grandes tailles efficaces entre épidémies s'explique principalement par les capacités saprophytes de *L. maculans* lui permettant de se maintenir sur les résidus de culture du colza, ces résidus constituant la



source des ascospores à l'origine des infections primaires la saison suivante. Plusieurs pratiques culturales permettent de réduire la production de cet inoculum primaire sur les résidus de culture d'une parcelle. Elles consistent à broyer et enfouir les résidus ou à appliquer des traitements fongicides sur ces résidus. Le recours systématique à ces pratiques réduirait d'une part la production d'inoculum avec pour conséquences à court terme la limitation du nombre d'infections primaires en début de saison culturale et donc les dégâts et les pertes moins importantes ; d'autre part à plus long terme ces pratiques accentuent les effets de la dérive génétique et pourraient conduire à une diminution de la diversité génétique des populations pathogènes, limitant ainsi les capacités d'adaptation du champignon face aux pressions de sélection imposées par les variétés résistantes. Les grandes tailles efficaces de population pourraient aussi s'expliquer par la persistance de *L. maculans* sur les repousses de colza et sur les nombreuses espèces hôtes sauvages du champignon, à condition que l'importance épidémiologique de ces sources alternatives soit démontrée. En effet les spores produites sur ces plantes pourraient contribuer au maintien de la diversité génétique dans la population pathogène et pourraient être à l'origine des infections primaires de la maladie. Des stratégies de fauchage des repousses de colza en bordure des parcelles mais aussi en bordure des itinéraires empruntés par les agriculteurs après la récolte limiteraient les sources possibles de spores à l'origine des épidémies et réduiraient les tailles efficaces de la population pathogène. Quant aux espèces sauvages hôtes de *L. maculans*, une étude australienne a indiqué que des souches isolées sur ces espèces possédaient des virulences correspondant à plusieurs gènes de résistance du colza, certains de ces gènes n'ayant pas été encore déployés en culture commerciale en Australie (Li *et al.*, 2005). La caractérisation des profils de virulence et de la diversité génétique des individus isolés sur ces espèces hôtes sauvages en France nous indiquerait dans quelle mesure les populations de *L. maculans* issues de ces hôtes sont susceptibles de contribuer à la diversité génétique globale de la population pathogène régionale ainsi qu'à l'adaptation aux gènes majeurs de résistance du colza.

L'absence de différenciation génétique entre populations éloignées géographiquement ne nous donne pas de bases scientifiques pour raisonner la séparation géographique entre parcelles ou entre régions de culture dans le cadre d'une stratégie de déploiement spatial des résistances spécifiques du colza. Le déploiement spatial serait peut être possible à une échelle plus grande, nationale voire continentale, échelle à laquelle les échanges d'individus virulents est biologiquement nulle (hors transport humain), autorisant ainsi le maintien de l'efficacité d'une résistance spécifique dans une région alors que cette efficacité est perdue dans une autre région isolée suite à l'adaptation de l'agent pathogène. Le suivi des fréquences des gènes d'avirulence à des échelles internationales montre pour certains



gènes des variations de la composition des populations pathogènes en fonction des pays d'origine ; trois allèles d'avirulence se sont révélés polymorphes en fonction de leur origine géographique en Europe (Stachowiak *et al.*, 2006). Ce diagnostic de la population pathogène est un moyen efficace de prédire l'efficacité d'une résistance spécifique dans une région donnée uniquement lors de son introduction, mais ne renseigne pas sur les capacités d'évolution de l'agent pathogène et ainsi sur la durabilité de la résistance introduite.

## Conclusions et perspectives

Contrairement aux pathosystèmes naturels aboutissant à des situations d'équilibre entre les agents pathogènes et les plantes hôtes, les systèmes agricoles permettent l'élaboration de stratégies agissant sur de la taille initiale de la population pathogène et son taux d'accroissement. L'ensemble des travaux menés durant cette thèse illustrent qu'il est possible de s'appuyer sur des facteurs épidémiologiques pour choisir des pratiques culturales permettant de réduire la taille des populations virulentes de *L. maculans* afin de réduire leur possibilité de reproduction sexuée et la propagation spatiale d'une virulence. La reproduction sexuée chez ce champignon donne lieu à la production de spores dispersées à longue distance permettant la diffusion d'une virulence dans la population pathogène régionale ; elle modifie les associations alléliques et permet la combinaison de plusieurs virulences ; elle génère de nouveaux génotypes et peut, par les mutations de type RIP, favoriser le passage de l'état avirulent à celui de virulent. A chaque étape du cycle épidémique, des méthodes de contrôle peuvent être utilisées pour restreindre les capacités de reproduction sexuée du champignon et préserver l'efficacité de résistances variétales spécifiques. Bien sûr ces méthodes de lutte interagissent avec les conditions environnementales ; l'appréciation de chaque situation est nécessaire à l'optimisation de ces méthodes.

De récents travaux de modélisation ont conduit à la création d'un simulateur permettant de tester les effets des systèmes de culture et de leur agencement spatial sur l'évolution des populations de *L. maculans* face aux résistances variétales du colza (Lô-Pelzer, 2008). Ce modèle se place aux échelles pluriannuelle et supra-parcellaire. Il serait intéressant d'utiliser nos résultats pour améliorer la représentation de la production d'inoculum issu de reproduction sexuée à l'échelle d'une parcelle en fonction des pratiques culturales. Les données acquises durant cette thèse sur la dispersion des pycnidiospores indiquent que ce mécanisme est important pour la rencontre des partenaires de la reproduction sexuée, et l'expérimentation au champ en cours permettra de préciser son importance pour la production de fructifications sexuées. La prise en compte de ce mécanisme pourrait être la



base d'un formalisme amélioré pour représenter les possibilités d'extinction de populations pathogènes virulentes sexuées sur une parcelle. En outre la survie des individus sans recourir à la reproduction sexuée et leur contribution à l'inoculum de la saison suivante sous forme de pycnidiospores n'est pas prise en compte dans ce modèle alors qu'elle pourrait avoir des conséquences sur l'adaptation des populations. Dans ce modèle, les résistances partielles ont un effet sur la sévérité de la maladie et nos résultats concernant la progression systémique du champignon pourraient permettre d'améliorer le formalisme utilisé et d'introduire explicitement un lien entre résistance partielle et production d'inoculum issu de reproduction sexuée.





## Références bibliographiques :

- Alabouvette C, Brunin B, 1970. Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. *Annales de Phytopathologie* **2**, 463-475.
- Allee WC, 1931. Animal aggregations, a study in general sociology. Illinois, The University of Chicago Press.
- Andrison D, Pilet F, Montarry J, Hafidi M, Corbiere R, Achbani EH, Pelle R, Ellisseeche D, 2007. Adaptation of *Phytophthora infestans* to partial resistance in potato: evidence from French and Moroccan populations. *Phytopathology* **97**, 338-343.
- Ansan-Melayah D, Balesdent MH, Delourme R, Pilet ML, Tanguy X, Renard M, Rouxel T, 1998. Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. *Plant Breeding* **117**, 373-378.
- Asseline J, Valentin C, 1978. Construction et mise au point d'un infiltromètre à aspersion. *Cahiers ORSTOM* **XV**, 321-349.
- Attard A, Gout L, Ross S, Parlange F, Cattolico L, Balesdent MH, Rouxel T, 2005. Truncated and RIP-degenerated copies of the LTR retrotransposon Pholy are clustered in a pericentromeric region of the *Leptosphaeria maculans* genome. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 30-41.
- Aubertot JN, Doré T, Le Floch D, Pinochet X, 2003. Cultural control: an alternative method for containing phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans*) of oilseed rape. *11th International Rapeseed Congress*, Copenhagen, 747-749.
- Aubertot JN, Barbier JM, Carpentier A, Gril JJ, Guichard L, Lucas P, Savary S, Savini I, Voltz M, 2005. Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. *Expertise scientifique collective, INRA/Cemagref*.
- Aubertot JN, West JS, Bousset-Vaslin L, Salam MU, Barbetti MJ, Diggle AJ, 2006. Improved resistance management for durable disease control: a case study of phoma stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 91-106.
- Aylor D, 1990. The role of intermittent wind in the dispersal of fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 73-92.
- Balesdent MH, Attard A, Kühn ML, Rouxel T, 2002. New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology* **92**, 1122-1133.
- Barbetti MJ, 1976. The role of pycniospores of *Leptosphaeria maculans* in the spread of blackleg disease in rape. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **16**, 911-913.

- Barrins JM, Ades PK, Salisbury PA, Howlett BJ, 2004. Genetic diversity of Australian isolates of *Leptosphaeria maculans*, the fungus that causes blackleg of canola (*Brassica napus*). *Australasian Plant Pathology* **33**, 529-536.
- Bayles RA, Flath K, Hovmøller MS, de Vallavieille-Pope C, 2000. Breakdown of the Yr 17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie* **20**, 805-811.
- Boukal DS, Berec L, 2002. Single-species models of the Allee effect: extinction boundaries, sex ratios and mate encounters. *Journal of Theoretical Biology* **218**, 375-94.
- Brown JKM. 2006. Surveys of variation in virulence and fungicide resistance and their application to disease control. In *The epidemiology of plant diseases*. Cooke BM, Jones DG, Kaye B (Eds.), Dordrecht, Springer, 81-115.
- Brun H, Renard M, Tribodet M, Plessis J, Tanguy X, 1989. Apport de la lutte génétique contre les maladies du colza. *Phytoma* **404**, 36-41.
- Brun H, Levivier S, Somda I, Ruer D, Renard M, Chevre AM, 2000. A field method for evaluating the potential durability of new resistance sources: application to the *Leptosphaeria maculans*-*Brassica napus* pathosystem. *Phytopathology* **90**, 961-966.
- Brun H, Besnard AL, Ermel M, Eber F, Chèvre AM, Renard M. 2007 Quantitative resistance associated with a very efficient major gene in a single *Brassica napus* genotype increases the potential durability of the resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Rapeseed Congress*, Wuhan, China, March 26-30, 167-170.
- Brunin B, Lacoste L, 1970. Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. II. Pouvoir pathogène des ascospores. *Annales de Phytopathologie* **2**, 477-488.
- Burdon JJ, 1992. Host population subdivision and the genetic structure of natural pathogen populations. *Advances in Plant Pathology* **8**, 81-94.
- Burdon JJ, 1993. Genetic variation in pathogen populations and its implications for adaptation to host resistance. in *Durability of disease resistance*. T. H. Jacobs and J. E. Parlevliet (Eds.), Kluwer Academic Publishers, 41-56.
- Burdon JJ, 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual Review of Phytopathology* **31**, 305-323.
- Burnett J, 2003. *Fungal populations and species*. New York, Oxford University Press.
- Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Topsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P, 1997. The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**, 695-705.

- Caffier V, de Vallavieille-Pope C, 1996. Regional distribution of resistances to powdery mildew in winter and spring cultivars in the northern part of France. *Plant Breeding* **115**, 94-100.
- Calonnec A, Goyeau H, De Vallavieille-Pope C, 1996. Effects of induced resistance on infection efficiency and sporulation of *Puccinia striiformis* on seedlings in varietal mixtures and on field epidemics in pure stands. *European Journal of Plant Pathology* **102**, 733-741.
- Carlier J, Lebrun MH, Zapater MF, Dubois C, Mourichon X, 1996. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, 499-510.
- Chèvre AM, Barret P, Eber F, Dupuy P, Brun H, Tanguy X, Renard M, 1997. Selection of stable *Brassica napus*-*B. juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptosphaeria maculans*). 1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 1104-1111.
- Clout MN, Merton DV, 1998. Saving the Kakapo: the conservation of the world's most peculiar parrot. *Bird Conservation International*, **8**: 281-296.
- Cook RJ, Yarham DJ, 2006. Epidemiology in sustainable systems. In The epidemiology of plant diseases. B. M. Cooke, D. Gareth Jones and B. Kaye (Eds.). Dordrecht, Springer.
- Courchamp F, Clutton-Brock T, Grenfell B, 1999. Inverse density dependence and the Allee effect. *Trends in Ecology and Evolution* **14**, 405-410.
- Cozijnsen AJ, Howlett BJ, 2003. Characterisation of the mating-type locus of the plant pathogenic ascomycete *Leptosphaeria maculans*. *Current Genetics* **43**, 351-357.
- Daboussi MJ, Capy P, 2003. Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Review of Microbiology* **57**, 275-99.
- Deadman M.L.. 2006. Epidemiological consequences of plant disease resistance. In The epidemiology of plant diseases. Cooke BM, Jones DG, Kaye B (Eds.), Dordrecht, Springer, 139-157.
- Delmotte F, Bucheli E, Shykoff JA, 1999. Host and parasite population structure in a natural plant-pathogen system. *Heredity* **82**, 300-308.
- Delourme R, Pilet-Nayel ML, Archipiano M, Horvais R, Tanguy X, Rouxel T, Brun H, Renard M, Balesdent MH, 2004. A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology* **94**, 578-583.
- Delourme R, Chèvre AM, Brun H, Rouxel T, Balesdent MH, Dias JS, Salisbury PA, Renard M, Rimmer SR, 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 41-52.

- Dixelius C, Forsberg J, 1999. Sexual transfer of *Arabidopsis* DNA to *Brassica napus*. *Plant Breeding* **118**, 565-567.
- Ebert D, Bull JJ, 2003. Challenging the trade-off model for the evolution of virulence: is virulence management feasible? *Trends in Microbiology* **11**, 15-20.
- Falahati-Rastegar M, Manners JG, Smart J, 1981. Effects of temperature and inoculum density on competition between races of *Puccinia hordei*. *Transactions of the British Mycological Society* **77**, 359-368.
- Ferreira ME, Rimmer SR, Williams PH, Osborn TC, 1995. Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. *Phytopathology* **85**, 213-217.
- Finckh MR, Wolfe MS. 2006. Diversification strategies. In The epidemiology of plant diseases. Cooke BM, Jones DG, Kaye B (Eds.), Dordrecht, Springer, 139-157.
- Fischer M, Matthies D, 1998. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany* **85**, 811-819.
- Fitt BDL, Gregory PH, Todd AD, McCartney HA, MacDonald OC, 1987. Spore dispersal and plant disease gradients ; a comparison between two empirical models. *Journal of Phytopathology* **118**, 227-242.
- Fitt BDL, Inman AJ, Lacey ME, McCartney HA, 1992. Splash dispersal of spores of *Pseudocercospora capsellae* (white leaf spot) from oilseed rape leaves of different inclination, flexibility and age. *Journal of Plant Diseases and Protection* **99**, 234-244.
- Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR, 2006. World-wide importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 3-15.
- Flor HH, 1956. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Advances in Genetics* **8**, 29-54.
- Flor HH, 1971. Current status of gene for gene concept. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 275-296.
- Fudal I, Ross S, Gout L, Blaise F, Kuhn ML, Eckert MR, Cattolico L, Bernard-Samain S, Balesdent MH, Rouxel T, 2007. Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of *AvrLm6*. *Molecular Plant Microbe Interactions* **20**, 459-70.
- Gabrielson RL, 1983. Blackleg disease of crucifers caused by *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) and its control. *Seed Science and Technology* **11**, 749-780.
- Gandon S, Capowiez Y, Dubois Y, Michalakakis Y, Olivieri I, 1996. Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society of London B* **263**, 1003-1009.

- Gandon S, Michalakakis Y, 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology* **15**, 451-462.
- Ganko EW, Bhattacharjee V, Schliekelman P, McDonald JF, 2003. Evidence for the contribution of LTR retrotransposons to *C. elegans* gene evolution. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 1925-31.
- Garrett KA, Bowden RL, 2002. An Allee effect reduces the invasive potential of *Tilletia indica*. *Phytopathology* **92**, 1152-1159.
- Ghanbarnia K, Fernando WGD, 2007. Pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* as primary inoculum and their infection on canola at different growth stages to develop a predictive model. *Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress IV*, 98-101.
- Gout L, Eckert M, Rouxel T, Balesdent MH, 2006. Genetic variability and distribution of mating type alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* from France. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 185-191.
- Gout L, Fudal I, Kuhn ML, Blaise F, Eckert M, Cattolico L, Balesdent MH, Rouxel T, 2006. Lost in the middle of nowhere: the *AvrLm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Microbiology* **60**, 67-80.
- Gout L, Kuhn ML, Vincenot L, Bernard-Samain S, Cattolico L, Barbetti M, Moreno-Rico O, Balesdent MH, Rouxel T, 2007. Genome structure impacts molecular evolution at the *AvrLm1* avirulence locus of the plant pathogen *Leptosphaeria maculans*. *Environmental Microbiology* **9**, 2978-92.
- Gregory PH, 1973. Microbiology of the atmosphere. Aylesbury, Leonard Hill.
- Guérin F, Le Cam B, 2004. Breakdown of the scab resistance gene *Vf* in apple leads to a founder effect in populations of the fungal pathogen *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **94**, 364-369.
- Guo XW, Fernando WGD, 2005. Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria maculans* from canola stubble in relation to environmental conditions. *Plant Disease* **89**, 97-104.
- Hall R, 1992. Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 46-55.
- Hall R, Chigogora JL, Phillips LG, 1996. Role of seedborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* in development of blackleg on oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **18**, 35-42.
- Hamilton WD, Axelrod R, Tanese R, 1990. Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **87**, 3566-3573.

- Hammond KE, Lewis BG, 1986. The timing and sequence of events leading to stem canker disease in populations of *Brassica napus* var. *oleifera* in the field. *Plant Pathology* **35**, 551-564.
- Hammond KE, Lewis BG, Musa TM, 1985. A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology* **34**, 557-565.
- Hanski I, 1998. Metapopulation dynamics. *Nature* **396**, 41-49.
- Harrison S, Hastings A, 1996. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 180-183.
- Hayden HL, Cozijnsen AJ, Howlett B, 2007. Microsatellite and minisatellite analysis of *Leptosphaeria maculans* in Australia reveals regional genetic differentiation. *Phytopathology* **97**, 879-887.
- Heath MC, 2001. Non-host resistance to plant pathogens: nonspecific defense or the result of specific recognition events? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **58**, 53-54.
- Hovmøller MS, Østergård H, Munk L, 1997. Modelling virulence dynamics of airborne plant pathogens in relation to selection by host resistance in agricultural crop. in The gene-for-gene relationship in host-parasite interactions. I. R. Crute, J. J. Burdon and E. B. Holub (Eds.). Oxon, CABI, 173-190.
- Howlett BJ, 2004. Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **26**, 245-252.
- Howlett BJ, Idnorum A, Pedras MSC, 2001. *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of Brassicas. *Fungal Genetics and Biology* **33**, 1-14.
- Huang YJ, Fitt BDL, Hall AM, 2003. Survival of A-group and B-group *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) ascospores in air and mycelium on oilseed rape stem debris. *Annals of Applied Biology* **143**, 359-369.
- Huang YJ, Li Z-Q, Evans N, Rouxel T, Fitt BDL, Balesdent MH, 2006. Fitness cost associated with loss of the *AvrLm4* avirulence function in *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker of oilseed rape). *European Journal of Plant Pathology* **114**, 77-89.
- Huang YJ, Pirie E, Evans N, Delourme R, King GJ, Fitt BDL, 2007. Understanding symptomless growth of *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* (oilseed rape) to manage phoma stem canker. *Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress IV*, 14-16.
- Humphry M, Consonni C, Panstruga R, 2006. *mlo*-based powdery mildew immunity: silver bullet or simply non-host resistance? *Molecular Plant Pathology* **7**, 605-610.
- Jenkinson P, Parry DW, 1994. Splash dispersal of conidia of *Fusarium culmorum* and *Fusarium avenaceum*. *Mycological Research* **98**, 506-510.

- Johnson R, 1981. Durable resistance : definition of, genetic control and attainment in plant breeding. *Phytopathology* **71**, 567-568.
- Johnson R, 1984. A critical analysis of durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **22**, 309-330.
- Kaltz O, Shykoff JA, 1998. Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity* **81**, 361-370.
- Khangura R, Barbetti MJ, 2001. Prevalence of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) on canola (*Brassica napus*) in Western Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **41**, 71-80.
- Kema GHJ, Sayoud R, Annone JG, Van Silfhout CH, 1996. Genetic variation for virulence and resistance in the wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. II. Analysis of interactions between pathogen isolates and host cultivars. *Phytopathology* **86**, 213-220.
- Kiyosawa S, 1982. Genetics and epidemiological modeling of breakdown of plant disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **20**, 93-117.
- Koenig WD, van Vuren D, Hooge PN, 1996. Detectability, philopatry, and the distribution of dispersal distances in vertebrates. *Trends in Ecology and Evolution* **11**, 514-517.
- Kuhn ML, Gout L, Howlett B, Melayah D, Meyer M, Balesdent MH, Rouxel T, 2006. Genetic linkage maps and genomic organization in *Leptosphaeria maculans*. *European Journal of Plant Pathology* **114**, 17-31.
- Lannou C, 2001. Intrapathotype diversity for aggressiveness and pathogen evolution in cultivar mixtures. *Phytopathology* **91**, 500-510.
- Leach JE, Vera Cruz CM, Bai J, Leung H, 2001. Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* **39**, 187-224.
- Leblois R, Estoup A, Rousset F, 2003. Influence of mutational and sampling factors on the estimation of demographic parameters in a "continuous" population under isolation by distance. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 491-502.
- Lepoivre P, 2003a. L'amélioration génétique de la résistance aux agents phytopathogènes. In *Phytopathologie*. Lepoivre P. (Ed.) Bruxelles, De Boeck Université, 259-288.
- Lepoivre P, 2003b. Les mécanismes de résistance et la spécificité parasitaire. In *Phytopathologie*. Lepoivre P. (Ed.) Bruxelles, De Boeck Université, 161-191.
- Lewis MA, Kareiva P, 1993. Allee dynamics and the spread of invading organisms. *Theoretical Population Biology* **43**, 141-158.
- Li H, Sivasithamparam K, 2003. Breakdown of a *Brassica rapa* subsp. *sylvestris* single dominant blackleg resistance gene in *B. napus* rapeseed by *Leptosphaeria maculans* field isolates in Australia. *Plant Disease* **87**, 752.



- Li H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ, Kuo J, 2004. Germination and invasion by ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* on spring-type *Brassica napus* canola varieties with varying susceptibility to blackleg. *Journal of General Plant Pathology* **70**, 261-269.
- Li H, Barbetti M, Sivasithamparam K, 2005. Hazard from reliance on cruciferous hosts as sources of major gene-based resistance for managing blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease. *Field Crops Research* **91**, 185-198.
- Li H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ, 2007. Blackleg disease (*Leptosphaeria maculans*) on oilseed rape - evidence for it being a polycyclic disease in Australia and implications for disease management. *Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress*, Wuhan, China
- Lindhout P, 2002. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica* **124**, 217-226.
- Lô-Pelzer E, Aubertot JN, David O, Jeuffroy MH, Bousset L, 2008. Experimental evidence for a relationship between the severity of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans*/L *biglobosa* species complex) and subsequent primary inoculum production on oilseed rape stubble. *Plant Pathology* (accepté).
- Lô-Pelzer E ,2008. Modélisation des effets des systèmes de culture et de leur répartition spatiale sur le phoma du colza et l'adaptation des populations pathogènes responsables de la maladie (*Leptosphaeria maculans*) aux résistances variétales. Thèse de doctorat, Paris, Agro Paris Tech.
- Lucas JA, 1998. Plant pathology and plant pathogens, Blackwell Publishing.
- Madden LV, 1992. Rainfall and the dispersal of fungal spores. *Advances in Plant Pathology* **8**, 39-79.
- Mahuku GS, Goodwin PH, Hall R, Hsiang T, 1997. Variability in the highly virulent type of *Leptosphaeria maculans* within and between oilseed rape fields. *Canadian Journal of Botany* **75**, 1485-1492.
- Marcroft SJ, Sprague SJ, Plymer SJ, Salisbury PA, Howlett BJ, 2004. Crop isolation, not extended rotation length, reduces blackleg (*Leptosphaeria maculans*) severity of canola (*Brassica napus*) in south-eastern Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **44**, 601-606.
- Mayr E, 1970. Population, species, and evolution. Cambridge, Belknap Press of Harvard University.
- McCartney HA, Fitt BDL, West J, 2006. Dispersal of foliar plant pathogens: mechanisms, gradients and spatial patterns. In *The epidemiology of plant diseases*. B. M. Cooke, D. Gareth Jones and B. Kaye (Eds). Dordrecht, Springer.

- McDonald BA, Linde C, 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 349-79.
- McDonald BA, Miles J, Nelson LR, Pettway RE, 1994. Genetic variability in nuclear DNA in field populations of *Stagonospora nodorum*. *Phytopathology* **84**, 250-255.
- McGee DC, 1977. Black leg (*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not.) of rapeseed in Victoria: sources of infection and relationships between inoculum, environmental factors and disease severity. *Australian Journal of Agricultural Research* **28**, 53-62.
- Mendes-Pereira E, Balesdent MH, Brun H, Rouxel T, 2003. Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-*L. biglobosa* species complex. *Mycological Research* **107**, 1287-1304.
- Milgroom MG, 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. *Annual Review of Phytopathology*, 349-379.
- Mundt CC, 1991. Probability of mutation to multiple virulence and durability of resistance gene pyramids: further comments. *Phytopathology* **81**, 240-242.
- Mundt CC, 2002. Use of multiline cultivars and cultivar mixtures for disease management. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 381-410.
- Nathan R, Perry G, Cronin JT, Strand AE, Cain ML, 2003. Methods for estimating long-distance dispersal. *Oikos* **103**, 261-273.
- Newton MR, Kinkel LL, Leonard KJ, 1997. Competition and density-dependent fitness in a plant parasitic fungus. *Ecology* **78**, 1774-1784.
- Nottingham JL, Silué D, 1992. Distribution of mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenic on rice. *Phytopathology* **82**, 412-424.
- Nürnberg T, Lipka V, 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, 335-345.
- Odum HT, Allee WC, 1954. A note on the stable point of populations showing both intraspecific cooperation and disoperation. *Ecology* **35**, 95-97.
- Olivieri I, Gouyon PH, 1997. Evolution of migration rate and other traits: the metapopulation effect. In *Metapopulation Biology*. Hanski, IA, Gilpin M. (Eds.). London, Academic Press, 293-323.
- Parkin IAP, Sharpe AG, Keith DJ, Lydiate DJ, 1995. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome* **38**, 1122-1133.
- Parlange F (2006). Analyse de l'environnement et clonage du gène *AvrLm4-7* chez l'ascomycète *Leptosphaeria maculans*. Thèse de Doctorat Paris, Université Paris-Sud.
- Penaud A, Bernard C, Maisonneuve C, Pérès A, Pilorgé E, 1999. Decision rules for a chemical control of *Leptosphaeria maculans*. *10th International Rapeseed Congress, Canberra*.

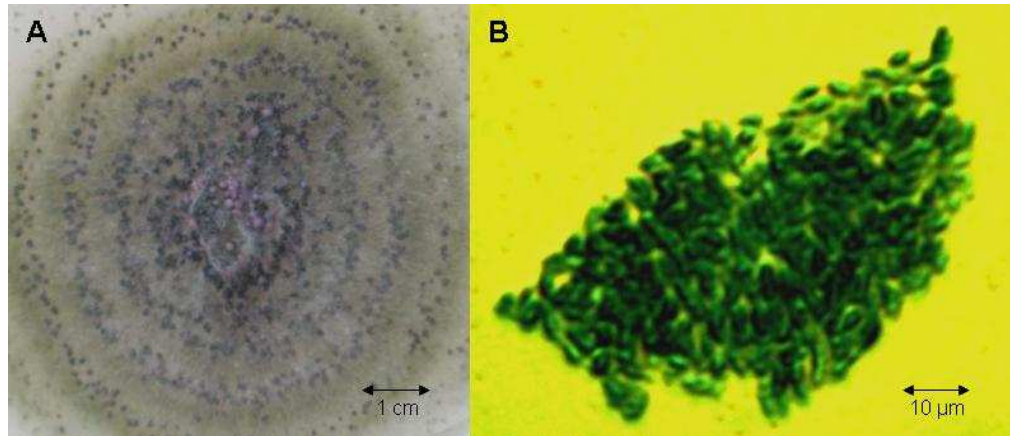
- Petrie GA, Lewis PA, 1985. Sexual compatibility of isolates of the rapeseed blackleg fungus *Leptosphaeria maculans* from Canada, Australia, and England. *Canadian Journal of Plant Pathology* **7**, 253-255.
- Pilet ML, Delourme R, Foisset N, Renard M, 1998. Identification of QTL involved in field resistance to light leaf spot (*Pyrenopeziza brassicae*) and blackleg resistance (*Leptosphaeria maculans*) in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* **97**, 398-406.
- Pinochet X, Mestries E, Penaud A, Delourme R, Chevre AM, Renard M, Brun H, Bousset L, Balesdent MH, Rouxel T, Aubertot JN, 2003. Towards a durable management of genetic resistances to *Leptosphaeria maculans*. *Oléagineux Corps gras Lipides* **10**, 208-211.
- Poisson B, Perès A, 1999. Study of rapeseed susceptibility to primary contamination of *Leptosphaeria maculans* in relation to the plant vegetative stage. *10th International Rapeseed Congress, Canberra*.
- Purwantara A, Barrins JM, Cozijnsen AJ, Ades PK, Howlett BJ, 2000. Genetic diversity of isolates of the *Leptosphaeria maculans* species complex from Australia, Europe and North America using amplified length polymorphism analysis. *Mycological Research* **104**, 772-781.
- Rapilly F, 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale, mycoses aériennes. Paris, INRA.
- Ridley M, 1996. Evolution. Oxford, Blackwell Scientific Publication.
- Rimmer SR, 2006. Resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* **28**, S288-S297.
- Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics* **145**, 1219-1228.
- Rousset F, 2000. Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* **13**, 58-62.
- Rouxel T, Penaud A, Pinochet X, Brun H, Gout L, Delourme R, Schmit J, Balesdent MH, 2003. A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the *Rlm1* resistance gene of oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* **109**, 871-881.
- Russell GE, 1979. Plant breeding for pest and disease resistance. Butterworth.
- Salam MU, Galloway J, Khangura R, Diggle AJ, MacLeod WJ, Barbetti MJ, 2001. Spatial spread of blackleg in canola - a regional scale simulation model. *Proceedings of the 12th Australian research assembly on Brassicas*.
- Schafer JF, 1971. Tolerance to plant disease. *Annual Review of Phytopathology* **9**, 235-252.

- Schiff CL, Wilson IW, Somerville SC, 2001. Polygenic powdery mildew disease resistance in *Arabidopsis thaliana*: quantitative trait analysis of the accession Warschau-1. *Plant Pathology* **50**, 690-701.
- Schmit J, West J, Narcy JP, Roux J, Balesdent MH, Rouxel T, Gout L, 2002. La nécrose du collet du colza : analyse de la distribution du champignon dans la plante à l'aide d'outils moléculaires. *Oléagineux Corps gras Lipides* **9**, 2-3.
- Schneider O, Roger-Estrade J, Aubertot JN, Doré T, 2003. Analysis of the effects of superficial and deep soil tillage on the vertical distribution of oilseed rape stubble: contribution to the integrated pest management of phoma stem canker. *11th International Rapeseed Congress*, Copenhagen, 854-856.
- Schwarzbach E, 1998. The *mlo* based resistance of barley to mildew and the response of mildew populations to the use of varieties with the *mlo* gene. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **34**, 3-10.
- Semal J, Lepoivre P, 2003. Les maladies des plantes: concepts généraux. . In *Phytopathologie*. Lepoivre P. (Ed.) Bruxelles, De Boeck Université, 9-22.
- Shaw MW, 2006. Pathogen population dynamics. in *The epidemiology of plant diseases*. B. M. Cooke, D. Gareth Jones and B. Kaye (Eds.). Dordrecht, Springer.
- Shoemaker RA, Brun H, 2001. The telomorph stage of the weakly aggressive segregate of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Botany* **79**, 412-419.
- Slatkin M, 1987. Gene flow and the geographical structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.
- Spielmeyer W, Singh R, McFadden H, Wellings C, Huerta-Espino J, Kong X, Appels R, Lagudah E, 2008. Fine scale genetic and physical mapping using interstitial deletion mutants of *Lr34 /Yr18* : a disease resistance locus effective against multiple pathogens in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **116**, 481-490.
- Stachowiak A, Olechnowicz J, Jedryczka M, Rouxel T, Balesdent M-H, Happstadius I, Gladders P, Latunde-Dada A, Evans N, 2006. Frequency of avirulence alleles in field populations of *Leptosphaeria maculans* in Europe. *European Journal of Plant Pathology* **114**, 67-75.
- Struck C. 2006. Infection strategies of plant parasitic fungi. In *The epidemiology of plant diseases*. Cooke BM, Jones DG, Kaye B (Eds.), Dordrecht, Springer, 117-137.
- Thompson JN, 1998. The population biology of coevolution. *Researches on Population Ecology* **40**, 159-166.
- Thrall PH, Burdon JJ, 1997. Host-pathogen dynamics in a metapopulation concept: the ecological and evolutionary consequences of being spatial. *Journal of Ecology* **85**, 743-753.

- Thrall PH, Burdon JJ, 1999. The spatial scale of pathogen dispersal: consequences for disease dynamics and persistence. *Evolutionary Ecology Research* **1**, 681-701.
- Thrall PH, Burdon JJ, 2002. Evolution of gene-for-gene systems in metapopulations: the effect of spatial scale of host and pathogen dispersal. *Plant Pathology* **51**, 169-184.
- Thrall PH, Burdon JJ, 2003. Evolution of virulence in a plant host-pathogen metapopulation. *Science* **299**, 1735-7.
- Turkington TK, Clayton GW, Klein-Gebbink H, Woods DL, 2000. Residue decomposition and blackleg of canola: influence of tillage practices. *Canadian Journal of Plant Pathology* **22**, 150-154.
- Van der Plank JE, 1963. Plant diseases: epidemics and control. New York, Academic Press.
- Venn L, 1979. The genetic control of sexual compatibility in *Leptosphaeria maculans*. *Australasian Journal of Plant Pathology* **8**, 5-6.
- Vera Cruz CM, Bai J, Ona I, Leung H, Nelson RJ, Mew TW, Leach JE, 2000. Predicting durability of a disease resistance gene based on an assessment of the fitness loss and epidemiological consequences of avirulence gene mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**, 13500-13505.
- Weir BS, Cockerham CC, 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- West JS, Biddulph JE, Fitt BDL, Gladders P, 1999. Epidemiology of *Leptosphaeria maculans* in relation to forecasting stem canker severity on winter oilseed rape in the UK. *Annals of Applied Biology* **135**, 535-546.
- West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL, 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**, 10-27.
- West JS, Fitt BDL, Leech PK, Biddulph JE, Huang YJ, Balesdent MH, 2002. Effects of timing of *Leptosphaeria maculans* ascospore release and fungicide regime on phoma leaf spot and phoma stem canker development on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in southern England. *Plant Pathology* **51**, 454-463.
- Wherrett AD, Sivasithamparam K, Barbetti MJ, 2003. Chemical manipulation of *Leptosphaeria maculans* (blackleg disease) pseudothecial development and timing of ascospore discharge from canola (*Brassica napus*) residues. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **54**, 837-848.
- Williams PH, 1992. Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 30-35.
- Wolfe MS, 1977. Population genetics of powdery mildew epidemics. *Annals of the New York Academy of Science*. **287**, 151-163.

- Wolfe MS, 1985. The current status and prospects of multiline cultivars and variety mixtures for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* **23**, 251-273.
- Wood PMR, Barbetti MJ, 1977. A study on the inoculation of rape seedlings with ascospores and pycnidiospores of the blackleg disease causal agent *Leptosphaeria maculans*. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* **4**, 79-80.
- Wright S, 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Wright S, 1943. Isolation by distance. *Genetics* **28**, 114-38.
- Wright S, 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**, 323-354.
- Wright S, 1969. Evolution and the genetics of populations. Chicago, University of Chicago Press.
- Xi K, Morrall RAA, Gugel RK, Verma PR, 1991. Latent infection in relation to the epidemiology of blackleg of spring rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology* **13**, 321-331.

**Figure A1.1:** A: Pycnides en cercles concentriques exsudant un mucilage rose sur milieu de culture en laboratoire. B: Amas de pycnidiospores colorées au bleu coton observées au microscope ( $\times 1000$ ).



## Annexe 1 : manuscrit d'un chapitre d'ouvrage

### Le Point sur le Phoma

Pinochet X (Ed), Quae éditions (à paraître en 2008)

#### - Épidémiologie et méthodes de contrôle -

#### Emission des pycnidiospores de *L. maculans*

Renaud Travadon, Lydia Bousset, Ivan Sache, Hortense Brun

Le Phoma du colza est généralement considéré comme une maladie monocyclique dont les épidémies sont déclenchées par les ascospores (West *et al.*, 2001). Néanmoins, les spores issues de multiplication asexuée du champignon, les conidies ou pycnidiospores, issues des plantes provenant de semences contaminées et de résidus de culture peuvent aussi être responsables d'infections primaires. (Hall *et al.*, 1996; Ghanbarnia & Fernando, 2007). Les pycnidiospores sont par ailleurs impliquées dans la dissémination en foyers de la maladie lors des infections secondaires (Barbetti, 1976).

#### *Aspects morphologiques des pycnides et pycnidiospores*

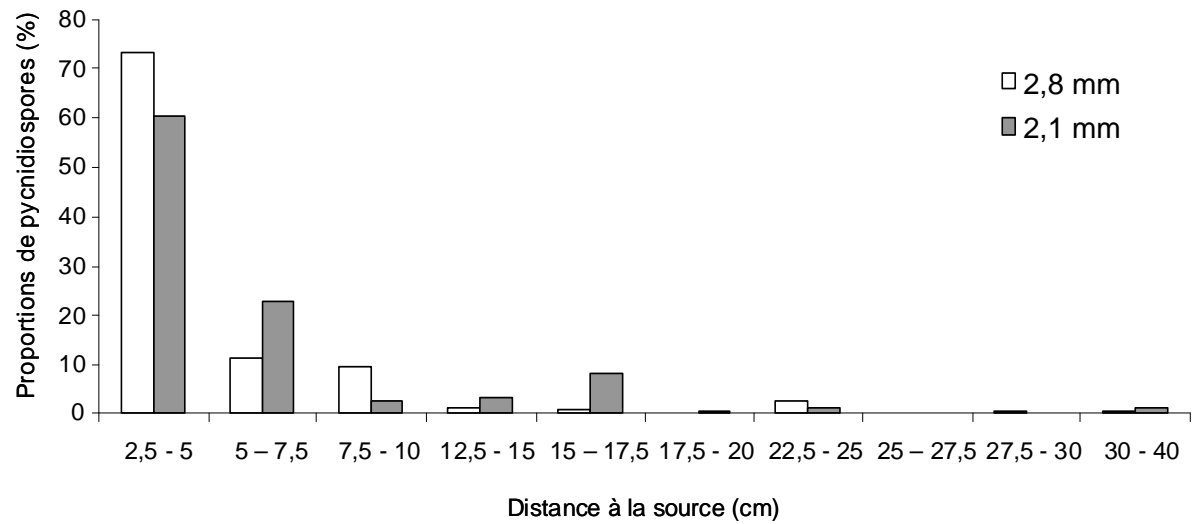
De taille comprise entre 3 et 6 µm de long et 1,5 et 2 µm de large, les pycnidiospores de *L. maculans* sont cylindriques et hyalines (Figure A1.1). Elles sont contenues dans les organes de fructification asexuée, les pycnides. Ces pycnides, globuleuses, noires, ouvertes par un ostiole, mesurant de 0,2 à 0,6 mm de diamètre, sont produites sur les tissus végétaux morts contaminés par le champignon, soit au niveau des macules, soit sur les résidus de tige de colza. En conditions environnementales favorables, les pycnides exsudent par leur ostiole des pycnidiospores engluées dans un mucilage de couleur rouge à rosâtre (Smith & Sutton, 1964; Boerema, 1976; Williams, 1992 ; Figure A1.1).

#### *Processus infectieux des pycnidiospores*

Comme les ascospores, les pycnidiospores adhèrent aux feuilles et/ou aux cotylédons. La germination des pycnidiospores dépend fortement des conditions environnementales. Au laboratoire, la germination nécessite une humidité saturante et continue d'au moins 16 heures. Elle se produit sur une gamme de températures allant de 5°C à 25°C et elle est optimale entre 20 et 25°C. À partir des pycnidiospores la formation des hyphes mycéliens germinatifs qui pénètrent dans la plante par les stomates ou des blessures débute après 12h



**Figure A1.2** : Proportions de pycnidiospores récoltées par classe de distance à la source sous l'action de 15 gouttes incidentes de 2,8 et 2,1mm de diamètre.



à 24°C, et la totalité des hyphes germinatifs est produite après 24h à 24°C (Hall, 1992). La sous-estimation du rôle épidémique des pycnidiospores par rapport à celui des ascospores est notamment due à des différences dans leur processus infectieux : (1) la germination, la pénétration des hyphes germinatifs et le développement des symptômes sont plus rapides (jusqu'à 2 jours plus tôt) à partir d'infections par des ascospores (Li. *et al.*, 2004); (2) la quantité de pycnidiospores nécessaire à l'infection est beaucoup plus grande que celle d'ascospores (Wood & Barbetti, 1977) et (3) les ascospores sont émises en grande quantité dès les premiers stades de la culture du colza et pendant parfois plusieurs mois.

### *Dispersion des pycnidiospores*

Des observations au champ ont révélé la dissémination de la maladie par les spores issues de multiplication asexuée suite à des épisodes pluvieux (Barbetti, 1976), ou bien, plus récemment, suite au piégeage de pycnidiospores lors des épisodes pluvieux (Guo & Fernando, 2005). Bien qu'ancrée dans les esprits l'existence de la dispersion par la pluie des pycnidiospores est longtemps restée basée sur des indices indirects. La dispersion par la pluie des pycnidiospores à partir de macules foliaires et de résidus de culture a été récemment déterminée de manière précise au laboratoire (Travadon *et al.*, 2007). Ce mécanisme de dispersion (*splashing*) se produit lorsque des gouttes de pluie entrent en collision avec les surfaces foliaires. Si la zone d'impact est porteuse de spores, ces dernières sont incorporées dans les gouttelettes d'éclaboussures et libérées hors de la zone d'impact (Fitt *et al.*, 1989). Les spores sont déposées lorsque les gouttelettes d'éclaboussure rencontrent un obstacle. Ce mécanisme de dispersion a été mis en évidence pour les pycnidiospores de *L. maculans* à l'aide d'un générateur de gouttes incidentes et d'un simulateur de pluie. Travadon *et al.* (2007) ont montré que la majorité des pycnidiospores est transportée dans les 14 cm autour de la source de pycnidiospores, cette distance de dispersion pouvant atteindre 40 cm (Figure A1.2). Cette étude des distances de dispersion corrobore les précédentes études menées au champ sur colza de printemps qui montrent la progression de la maladie au cours d'une saison par l'intermédiaire des pycnidiospores jusqu'à 105 cm à partir des rangs inoculées (Barbetti, 1976), ou bien jusqu'à 216 cm à partir de rangs issus de semences contaminées (Hall *et al.*, 1996). Les plus grandes distances de dispersion des pycnidiospores décrites dans ces deux études comparativement aux résultats obtenus expérimentalement s'expliquent par la succession de plusieurs cycles secondaires au cours de la saison ainsi que par l'action du vent, qui augmente les distances de dispersion des gouttelettes d'éclaboussure contenant les pycnidiospores.



### *Contaminations primaires par les pycnidiospores*

Les infections primaires par les pycnidiospores se produisent soit à partir de résidus de culture, soit à partir de graines contaminées. Le champignon est capable de survivre sur les résidus de culture sous forme de mycélium dormant (Baird *et al.*, 1999). Lorsque les conditions de température, d'éclairement et d'humidité relative deviennent favorables, ce mycélium peut produire des pycnides. La production de pycnides sur les résidus est généralement abondante et dure tout au long de la saison de culture au Canada et en Australie (Guo & Fernando, 2005; Li *et al.*, 2007a). On peut cependant signaler que dans ces pays, les résidus de culture sont laissés en surface en raison de la prépondérance des techniques simplifiées de travail du sol, par exemple le semis direct. La transmission de la maladie à partir de ces résidus est possible soit par le transport par la pluie des pycnidiospores vers les plantes saines, soit par contact direct de ces résidus avec des feuilles de colza (Hall, 1992). Ces infections primaires par les pycnidiospores à partir de résidus de culture ont récemment été mises en évidence au Canada (Ghanbarnia & Fernando, 2007) et au cours de l'automne 2007 en France (Travadon, données non publiées).

La seconde source d'infection primaire due aux pycnidiospores est constituée par les graines contaminées. Cette source d'inoculum n'est pas négligeable car le transport humain des graines contaminées permet l'introduction de la maladie dans des régions de culture jusqu'alors dépourvues de Phoma. Ce mode d'infection primaire a été révélé au Canada dans un essai au champ où a été suivi le développement épidémique du Phoma à partir de rangs semés avec des graines contaminées (Hall *et al.*, 1996). Cette étude a montré qu'il existait une corrélation forte entre le taux d'infection des graines au semis et l'incidence et la sévérité des nécroses du collet en fin de saison, ainsi qu'avec le nombre de graines infectées à la récolte.

### *Contaminations secondaires par les pycnidiospores*

Les pycnidiospores agissent également en tant qu'inoculum secondaire. En conditions contrôlées, les pycnidiospores sont capables de survivre plusieurs jours sur un sol sableux et humide et ensuite d'infecter les feuilles de colza (Li *et al.*, 2007b). À partir des macules foliaires, les pycnidiospores sont dispersées par la pluie vers les autres feuilles d'une même plante et vers les plantes voisines. Sous des conditions favorables, l'expansion de la maladie par cycles secondaires pourrait être très efficace puisque d'une part, la libération et le



transport des pycnidiospores se produisent dès l'impact des toutes premières gouttes de pluie sur une macule sporulante et que d'autre part la production n'est toujours pas tarie après les impacts successifs de 140 gouttes incidentes au laboratoire (Travadon *et al.*, 2007). Cependant, l'importance des cycles secondaires a longtemps été considérée comme négligeable car les pertes de rendement occasionnées par le Phoma ont été la plupart du temps directement associées aux infections primaires par les ascospores. Par conséquent, les observations au champ visant à caractériser la nature polycyclique de la maladie ont été très rares (Barbetti, 1976; Hall *et al.*, 1996). Dans la littérature, seules les conditions climatiques de l'ouest australien semblent conférer un rôle épidémiologique important aux pycnidiospores dont les infections les plus sévères peuvent conduire à la destruction des plantules. On peut remarquer qu'en Australie et au Canada le colza est une culture de printemps, ce qui implique des températures favorables à la réceptivité des feuilles lors des cycles secondaires. En Europe, les basses températures hivernales peuvent réduire la réceptivité des feuilles, cependant le potentiel épidémique des pycnidiospores ne devrait pas être sous-estimé, notamment lorsque peu d'ascospores sont émises en début de saison culturale. En effet, des co-inoculations avec des ascospores en conditions contrôlées ont révélé une augmentation de la capacité infectieuse des pycnidiospores, même à faible concentration, comparée aux pycnidiospores inoculées seules (Li *et al.*, 2006). Il serait intéressant d'approfondir les études sur les interactions entre ces deux types de spores émises simultanément durant le cycle cultural et de mieux connaître leur influence sur la nuisibilité des épidémies. Une contribution supplémentaires des pycnidiospores à l'épidémie pourrait se faire via l'infection directe des tiges de colza par blessures d'insectes (Newman, 1984) ou par les racines (Sosnovski *et al.* 2001 ; Li *et al.* 2007b) qui peuvent être réalisées en conditions contrôlées et sont postulées en conditions naturelles (Xi *et al.* 1991).

#### *Les pycnidiospores et la dynamique des populations de L. maculans*

Dans le cas d'épidémies de Phoma initiées par une quantité importante d'ascospores, les pycnidiospores semblent avoir peu d'influence sur le développement épidémique du Phoma, même si l'augmentation de la quantité de macules par contaminations secondaires sur une même plante pourrait augmenter l'incidence et la sévérité des nécroses au collet (renvoi interne à l'ouvrage, partie sur la systémie). En revanche, lorsque peu d'ascospores sont disponibles pour déclencher l'épidémie, par exemple suite au déploiement commercial d'une variété de colza portant une source de résistance spécifique nouvelle, le rôle des pycnidiospores pourrait être crucial dans la cinétique du contournement de cette résistance. En effet, les cycles secondaires augmentent le nombre de macules et ainsi la taille de la population virulente. De plus, l'augmentation du nombre de macules accroît la probabilité de



rencontre dans la tige d'une même plante de souches des 2 types sexuels compatibles et donc la probabilité de reproduction sexuée du champignon et de production d'ascospores. Lorsque la reproduction sexuée est peu fréquente, après la survie estivale du mycélium, les pycnidiospores produites sur résidus de culture ou sur les plantules issues du semis de graines contaminées peuvent causer des infections primaires de la maladie et sous des conditions favorables déclencher une épidémie (Barbetti, 1976). Des études au champ sont encore nécessaires pour clarifier l'importance épidémique des pycnidiospores.

### Références bibliographiques:

- Baird RE, Phillips DV, Mullinix BG, Alt PJ, 1999. Relative longevity of *Leptosphaeria maculans* and associated mycobiota on canola debris. *Phytoprotection* **80**, 1-11.
- Barbetti MJ, 1976. The role of pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* in the spread of blackleg disease in rape. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* **16**, 911-913.
- Boerema GH, 1976. The *Phoma* species studied in culture by Dr R. W. Dennis. *Transactions of the British Mycological Society* **67**, 289-319.
- Fitt BDL, McCartney HA, Walklate PJ, 1989. The role of rain in dispersal of pathogen inoculum. *Annual Review of Phytopathology* **27**, 241-270.
- Ghanbarnia K, Fernando WGD, 2007. Pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* as primary inoculum and their infection on canola at different growth stages to develop a predictive model. *Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress IV*, 98-101.
- Guo XW, Fernando WGD, 2005. Seasonal and diurnal patterns of spore dispersal by *Leptosphaeria maculans* from canola stubble in relation to environmental conditions. *Plant Disease* **89**, 97-104.
- Hall R, 1992. Epidemiology of blackleg of oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 46-55.
- Hall R, Chigogora JL, Phillips LG, 1996. Role of seedborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* in development of blackleg on oilseed rape. *Canadian Journal of Plant Pathology* **18**, 35-42.
- Li H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ, 2007a. Blackleg disease (*Leptosphaeria maculans*) on oilseed rape - evidence for it being a polycyclic disease in Australia and implications for disease management. *Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress I*, 416-419.
- Li H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ, 2007b. Soilborne ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* can contribute significantly to blackleg disease epidemiology in oilseed rape (*Brassica napus*) in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* **36**, 439-444.
- Li H, Tapper N, Dean N, Barbetti MJ, Sivasithamparam K, 2006. Enhanced pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores from paired co-inoculation of *Brassica napus* cotyledons with ascospores. *Annals of Botany* **97**, 1151-1156.
- Li H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ, Kuo J, 2004. Germination and invasion by ascospores and pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* on spring-type *Brassica napus* canola varieties with varying susceptibility to blackleg. *Journal of General Plant Pathology* **70**, 261-269.
- Newman PL, 1984. Differential host-parasite interactions between oilseed rape and *Leptosphaeria maculans*, the causal fungus of stem canker. *Plant Pathology* **33**, 205-210.
- Smith HC, Sutton BC, 1964. *Leptosphaeria maculans* the ascogenous state of *Phoma lingam*. *Transactions of the British Mycological Society* **47**, 159-165.





- Sosnowski M, Ramsey M, Murray G, Scott E, Wilmshurst C (2001). Symptoms of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) on the roots of canola in Australia. *Plant Pathology*, **50**, 808.
- Travadon R, Bousset L, Saint-Jean S, Brun H, Sache I, 2007. Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* **56**, 595-603.
- West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL, 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology* **50**, 10-27.
- Williams PH, 1992. Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **14**, 30-35.
- Wood M, Barbetti MJ, 1977. A study on the inoculation of rape seedlings with ascospores and pycnidiospores of the blackleg disease causal agent *Leptosphaeria maculans*. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* **4**, 79-80.
- Xi K, Morrall RAA, Gugel RK, Verma PR (1991). Latent infection in relation to the epidemiology of blackleg of spring rapeseed. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **13**, 321-31.



## **Annexe 2 : manuscrit d'un chapitre d'ouvrage**

### **Le Point sur le Phoma**

Pinochet X (Ed), Quae éditions (à paraître en 2008)

#### **- Epidémiologie et méthodes de contrôle -**

### **Progression systémique du champignon dans la plante**

Lydia Bousset, Renaud Travadon, Jacques Schmit

Les nécroses du collet sont principalement initiées suite au cheminement systémique du champignon à partir des macules foliaires. Nous présenterons d'abord les aspects histologiques de cette colonisation systémique, puis les facteurs qui influencent sa réussite et enfin nous aborderons les conséquences pour le fonctionnement des populations de l'agent pathogène (spécifique au Phoma).

#### *Cheminement du champignon dans la plante*

Hammond et Lewis (1986) ont décrit le processus d'entrée du champignon dans la tige via le limbe et le pétiole selon cinq étapes successives : l'infection latente du limbe, l'expression des macules, la croissance asymptomatique (sans symptôme visible) dans le pétiole, l'infection latente de la tige et enfin le développement de la nécrose dans la tige. En inoculant des feuilles avec des conidies ou des ascospores après blessure, Hammond et Lewis (1987a) ont également montré que l'établissement initial du champignon dans le mésophylle est asymptomatique, puis les hyphes explorent les espaces intercellulaires en nécrosant les cellules ce qui induit une macule au contour bien net et ensuite la phase systémique biotrophe s'enclenche. Le champignon rejoint une nervure et chemine dans le pétiole par les vaisseaux du xylème entre les cellules du parenchyme du xylème et le cortex (Hammond et al. 1985). A la fin, l'invasion des cellules corticales se traduit par une nécrose. En inoculant avec blessure à la base de la première feuille, ces mêmes auteurs ont montré que lorsque le champignon passe du pétiole dans la tige la phase nécrotrophe débute lorsque les hyphes envahissent les cellules du parenchyme (Hammond et Lewis 1987b). L'analyse de tiges issues du champ a permis de postuler que les nombreux hyphes étroits dans l'épiderme et le cortex de la tige correspondent à la phase biotrophe du champignon, alors que dans les plantes plus âgées les hyphes plus épais correspondent à la phase nécrotrophe (Xi et Morrall 1993). Au collet, la première phase non visible au champ est la dissociation des tissus du parenchyme cortical qui induit des perturbations physiologiques



entraînant un déséquilibre hydrique de la plante (Brunin 1972). La seconde phase est la nécrose des tissus due à la lignification désordonnée qui provoque l'obstruction des vaisseaux, la mort des cellules et la verse de la plante.

Les deux espèces *Leptosphaeria maculans* et *Leptosphaeria biglobosa* se comportent de manière différente durant la phase systémique. Des différences entre « isolats » « agressif » et « non agressif » ont été décrites en conditions contrôlées (Hammond et Lewis 1987b) ces isolats pourraient correspondre en fait aux deux espèces *L. maculans* et *L. biglobosa*, respectivement. *L. maculans* colonise plus profondément la tige que *L. biglobosa* en causant des nécroses sévères au collet (Fitt *et al.* 2006). Les optima thermiques des deux espèces sont également différents. Sur colza d'hiver *L. maculans* domine sur les feuilles en automne, puis la proportion de *L. biglobosa* augmente pendant l'hiver pour décroître en fin de cycle avec de nouveau dominance de *L. maculans* au collet et sur la partie basse des tiges (Schmit *et al.* 2002 ; West *et al.* 2002).

Les études au laboratoire sur la phase systémique du champignon seront à l'avenir facilitées par l'existence de souches transformées exprimant le gène de la GFP (Green Fluorescent Protein) permettant d'observer la progression du champignon dans la plante de manière non destructive par analyse de la fluorescence émise (Huang *et al.* 2006). Le développement de techniques de PCR quantitative (Keynon *et al.*, 2004) permettant une quantification précise du mycélium fongique dans la tige permettra également des comparaisons précises entre variétés en lien avec le niveau de résistance partielle.

#### *Influence de la température et de la variété*

La phase de croissance systémique asymptomatique et biotrophe peut se réaliser sous une large gamme de températures (Hammond *et al.* 1985) et la température influence l'expression des nécroses au collet. Sur des plantules infectées en conditions contrôlées, l'apparition des nécroses est plus lente au régime le plus froid (12/7°C) et donne des nécroses molles sans pycnides. Au contraire, aux régimes plus chauds (18/11°C et 24/15°C) les nécroses occasionnées sont sèches, portent beaucoup de pycnides et entraînent la mort de la plante (Barbetti 1975). Lorsque des plantules inoculées ont produit des plantes asymptomatiques sous tunnel en hiver, le transfert à des températures plus chaudes (18-20°C) a entraîné l'apparition rapide de nécroses (Nathaniels et Taylor 1983). De même, l'incubation en serre de plantes issues du champ a permis l'expression de nécroses plus rapidement que sur les plantes laissées au champ (Nuzum et Kaldor 1988). Ceci illustre le rôle du retour à des températures plus élevées sur l'expression des nécroses. De même, sur colza d'hiver, le passage par une phase de basse température (6°C) avant retour à 20°C



permet l'obtention de nécroses sur des plantules en conditions contrôlées (Travadon *et al.*, 2008).

La variété, de par son niveau de résistance partielle, influence la progression systémique du champignon. Entre les variétés Rapora, Primor et Jet Neuf, des différences qualitatives et quantitatives de réponses cellulaires ont été mises en évidence (Hammond et Lewis 1987b). La lignification est plus précoce sur la variété résistante laquelle ? (Brunin 1972). Lorsque des plantules de variétés résistantes et sensibles ont été exposées à l'inoculum naturel chaque semaine, une infection identique des pétioles a été observée, mais la résistance a induit une réduction du pourcentage d'infection de la tige (Xi *et al.*, 1991). Ceci est en accord avec les observations au champ (Delourme *et al.*, 2006). Sur plantules en conditions contrôlées, l'incidence et la sévérité des nécroses du collet sont significativement réduites sur une lignée de colza avec résistance partielle (Travadon *et al.*, 2008). Cependant, en inoculant les plantes avec blessure à la base de la feuille, la distance parcourue par les hyphes du champignon dans le pétiole à 16 et 22 jours après inoculation était la même sur les variétés Eurol et Darmor (avec résistance partielle) (Huang *et al.*, 2006).

#### *Prévoir les nécroses sévères*

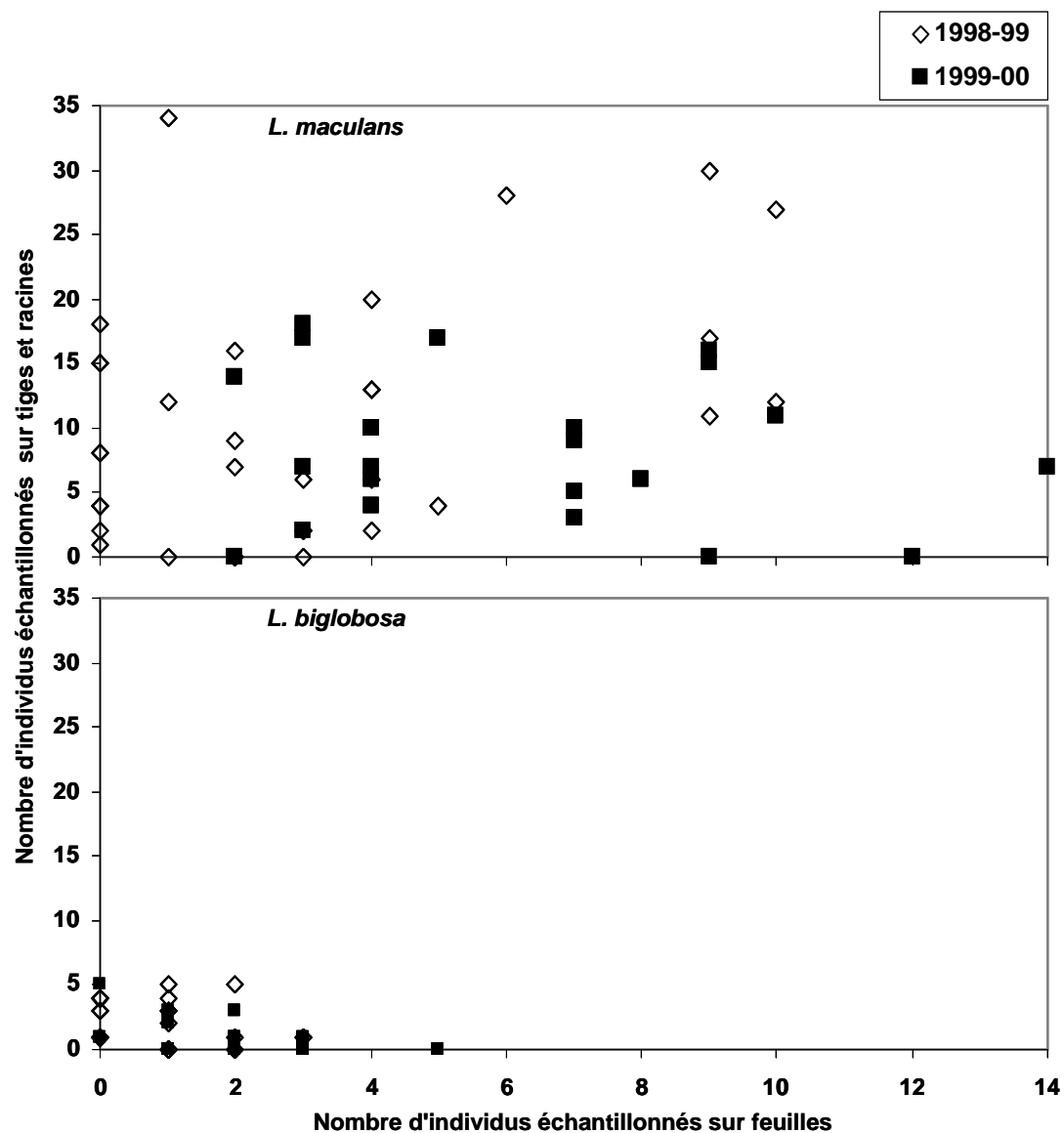
Les pertes de rendement du colza étant liées à la présence de nécroses sévères au collet, il est important de pouvoir prévoir leur occurrence dès l'automne (renvoi interne à l'ouvrage, partie sur la nuisibilité). Le succès de la progression systémique du champignon implique d'avoir rejoint la tige avant l'abscission de la feuille, évènement lié à la température et au phyllochrone (Hammond et Lewis 1986) dépendant de la lumière reçue par la feuille. L'occurrence de nécroses sévères est liée à la présence de macules sur les premières feuilles en automne, les plantes étant plus sensibles avant le stade 6 feuilles (Brunin et Lacoste 1970, Poisson et Pérès 1999; Aubertot *et al.*, 2004). Plusieurs travaux sont publiés ou en cours pour modéliser la relation entre la présence de macules sur feuilles et le développement des nécroses au collet (Sun *et al.*, 2000 ; 2001 ; Aubertot *et al.*, 2004 ; Gladders *et al.*, 2006 ; Lô-Pelzer *et al.*, 2007 ; soumis ; renvoi interne à l'ouvrage, partie sur la modélisation).

#### *Conséquences pour la transmission de descendants*

Au sein des populations de *L. maculans*, la transmission de descendants entre saisons culturales peut se produire par la dispersion à courtes distances de conidies par la pluie (Travadon *et al.*, 2007 ; renvoi interne à l'ouvrage, partie sur les pycnidiospores) mais



**Figure A2.1** : Relation entre le nombre d'individus de *Leptosphaeria maculans* et de *L. biglobosa* caractérisés par leur profil, échantillonnés sur les feuilles de la variété Capitot en début d'épidémie et sur la tige ou les racines en fin d'épidémie pour deux années de prélèvement.



surtout par la dispersion à grande distance d'ascospores issues de reproduction sexuée (renvoi interne à l'ouvrage, partie sur la dispersion). L'accès à la reproduction sexuée au collet est conditionné par la réussite de la colonisation systémique concomitante de deux individus de types sexuels complémentaires. Les conséquences de la phase systémique pour le fonctionnement des populations ont été étudiées en conditions contrôlées et au champ.

A l'aide d'inoculations en conditions contrôlées Travadon *et al.*, (2008) ont montré que pour un individu donné, augmenter le nombre de points d'infections sur cotylédons accroît l'incidence et la sévérité des nécroses au collet. Ceci correspondrait au champ soit à une plante ayant reçu plusieurs contaminations par les ascospores, soit à une plante qui se serait auto-infectée lors de cycles secondaires de dispersion des conidies par la pluie (Travadon *et al.*, 2007 ; renvoi interne à l'ouvrage, partie sur les pycnidiospores) ou qui serait contaminée par plusieurs ascospores. Cependant, durant la progression systémique une compétition entre individus peut intervenir. Le succès de colonisation de la tige dépend alors des quantités relatives d'infections cotylédonaires de chaque individu. (Travadon *et al.*, 2008).

En parcelles expérimentales lors des saisons culturales 1998-1999 et 1999-2000, les macules ont été échantillonnées à différentes dates entre novembre et mars, puis des prélèvements au collet des mêmes plantes ont été réalisés en mai ou juin. Les individus isolés ont été caractérisés à l'aide de marqueurs ITS et ISSR et pour leur type sexuel. La coexistence de plusieurs individus sur une même plante a été confirmée à la fois sur les feuilles et dans les tiges (Schmit *et al.*, 2002). Il a également été montré qu'un individu échantillonné sur les feuilles pouvait être retrouvé en fin de saison au collet de la plante, qu'un individu donné pouvait coloniser un volume important de plusieurs tissus (cortex, bois et moelle) et que la fréquence des types sexuels pouvait être déséquilibrée au collet (Schmit *et al.*, 2002).

Nous avons pu préciser ces différents éléments de fonctionnement des populations en complétant l'analyse des données de Schmit *et al.*, (2002). Ainsi pour les deux saisons culturales, le nombre d'individus isolés au collet en fin d'épidémie est très variable, quelle que soit l'espèce considérée (Figure A2.1, Tableau A2.1). Ce nombre n'est pas corrélé au nombre d'individus échantillonnés sur les feuilles. Un grand nombre d'individus différents peuvent être retrouvés au collet d'une même plante, jusqu'à 34 sur l'une des plantes de l'étude (Tableau A2.1). Ceci laisse supposer de multiples possibilités de rencontre de partenaires en vue de la reproduction sexuée à la base des plantes. Cependant, l'analyse plus fine menée sur un nombre restreint de plante précise ce résultat (Tableau A2.2). On note en effet que si globalement des individus des deux types sexuels sont présents sur les feuilles et à la base des plantes, il existe des individus (11 sur 77) qui se retrouvent sans

**Tableau A2.1** : Nombre moyen d'individus de *Leptosphaeria maculans* et de *L. biglobosa* échantillonnés par plante sur la variété Capitot sur les feuilles en début d'épidémie (novembre, janvier, mars) et sur le collet, la racine ou la base de la tige en fin d'épidémie (mai et juin) pour deux années de prélèvement.

Espèce	<i>L. maculans</i>		<i>L. biglobosa</i>	
	1998-99	1999-00	1998-99	1999-00
Nombre de plantes	33	24	28	24
Nombre moyen d'individus par plante [extrêmes]				
Sur feuilles	3,1 [0-10]	6,1 [0-14]	0,8 [0-3]	1,8 [0-5]
Sur collet, racine ou base de tige	10,5 [0-34]	8,2 [0-18]	2,0 [0-5]	0,9 [0-5]

**Tableau A2.2** : Occurrence des deux types sexuels et redondance de la détection des individus de *Leptosphaeria maculans* échantillonnés par plante de la variété Capitot sur feuilles en début d'épidémie et sur collet, racine ou base de tige en fin d'épidémie pour deux années de prélèvement. Les individus ont été identifiés par leurs profils moléculaires (marqueurs ISSR et marqueur de type sexuel Mat). La redondance de la détection d'un même profil moléculaire indique que l'individu a colonisé un volume conséquent de tissus dans un ou plusieurs organes. La reproduction sexuée à la base de la plante n'est possible qu'en présence concomitante de partenaires de chacun des deux types sexuels.

Année	1998-1999						1999-2000									
Plante	a		b		c		d		e		f		g		h	
Type sexuel (locus Mat)	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Feuilles	3	6	4	5	0	3	4	10	3	3	4	3	5	3	1	1
Détection à la base de la plante																
unique	8	2	7	0	2	0	1	3	4	1	4	6	11	3	4	6
multiple, même organe *	2	3	1	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	1
dans plusieurs organes *	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Reproduction à la base de la plante**																
possible	11	6					2	3	4	3	4	6	12	3	5	7
impossible			9	0	2	0										

\* Les organes distingués sont le collet, la racine et la base de la tige

\*\* La reproduction sexuée est possible en présence d'individus d'un second type sexuel à la base de la même plante. Elle est impossible si tous les individus appartiennent à un seul type sexuel.

partenaire du type sexuel complémentaire. En effet, sur deux plantes parmi les 8 étudiées, tous les individus détectés à la base de la plante appartiennent au même type sexuel, ce qui rend la reproduction sexuée impossible (Tableau A2.2). Enfin, la présence d'individus des deux types sexuels ne garantit pas la rencontre effective des mycéliums fongiques indispensable à la reproduction sexuée. Or aucune étude n'a évalué la relation entre la position des point d'infection foliaires (sur la même feuille ou non), les voies de colonisation systémique (à travers les mêmes vaisseaux ou non) et le contact effectif des mycéliums à la base de la plante. La redondance de détection des mêmes profils moléculaires n'est pas directement transposable en volume occupé par les individus, mais nous permet de confirmer que certains individus colonisent un volume conséquent de tissus. Si à la base de la plante 62 individus sont détectés une seule fois, 11 sont détectés plusieurs fois dans le même organe et 4 sont détectés dans différents organes (base de tige, collet, racine) (Tableau A2.2). Ces résultats soulignent le besoin de recherches plus approfondies pour faire le lien entre la présence de plusieurs individus sur une même plante et leur accès effectif à la reproduction sexuée et donc à la transmission de descendants, en lien avec la phase de colonisation systémique. Ce sujet étant crucial par exemple pour comprendre les contournements de résistances spécifiques, ou le mode d'action de la résistance partielle. De telles études bénéficieront grandement de la disponibilité de souches GFP permettant des analyses histologiques non destructives (Huang *et al.*, 2006).

### Références bibliographiques :

- Aubertot JN, Pinochet X, Reau R, Doré T (2004) SimCanker: a simulation model for containing phoma stem canker of oilseed rape through cultural practices. *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress. 26 September–1 October. Brisbane, Australia.* <http://www.regional.org.au/au/cs/2004/>
- Barbetti MJ (1975). Effects of temperature on development and progression in rape of crown canker caused by *Leptosphaeria maculans*. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*, **15**, 705-8.
- Brunin B (1972). Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. III. Aspects anatomiques de la nécrose du collet. *Annals of Phytopathology*, **4**, 87-96.
- Brunin B, Lacoste L (1970). Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not., II: pouvoir pathogène des ascospores. *Annals of Phytopathology*, **2**, 477-488.
- Delourme R, Chèvre AM, Brun H, Rouxel T, Balesdent M, Dias JS, Salisbury P, Renard M, Rimmer SR (2006). Major gene and polygenic resistance to *L. maculans* in oilseed rape (*Brassica napus*) *European Journal of Plant Pathology* **114**: 41-52.
- Fitt BDL, Huang YJ, van den Bosch F, West JS (2006). Coexistence of related pathogen species on arable crops in space and time. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 163-182.
- Gladders P, Evans N, Marcroft SJ, Pinochet X (2006). Dissemination of information about management strategies and changes in farming practices for the exploitation of resistance to *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker). *European Journal of Plant Pathology* **114**: 117-126.



- Hammond KE, Lewis BG (1986). The timing and sequence of events leading to stem canker disease in populations of *Brassica napus* var. *oleifera* in the field. *Plant Pathology*, **35**, 551-64.
- Hammond KE, Lewis BG (1987a). The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology*, **36**, 135-47.
- Hammond KE, Lewis BG (1987b). Variation in stem infections caused by aggressive and non-aggressive isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* var. *oleifera*. *Plant Pathology*, **36**, 53-65.
- Hammond KE, Lewis BG, Musa TM (1985). A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology*, **34**, 557-65.
- Huang YJ, Pirie E, Evans N, Delourme R, King GJ, Fitt BDL (2006). Understanding symptomless growth of *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus* (oilseed rape) to manage phoma stem canker. . 11<sup>th</sup> Rapeseed Congress 26-30 March 2007, Wuhan, China.
- Kenyon DM, Thomas JE, Handy C (2004). Feasibility of using quantitative PCR for assessing resistance to stem canker in oilseed rape cultivars. IOBC meeting Oilseeds section, 2004, Rothamsted
- Li H, Sivasithamparam K, Barbetti MJ (2007). Soilborne ascospores and pycniospores of *Leptosphaeria maculans* can contribute significantly to blackleg disease epidemiology in oilseed rape (*Brassica napus*) in Western Australia. *Australasian Plant Pathology* **36**, 439-444.
- Lô-Pelzer E, Aubertot JN, Bousset L, Jeuffroy MH, Salam MU (2007). Modelling for durable resistance of canola to blackleg: combining management strategies for a collective disease control at a regional scale *APS annual meeting July 28-August1 2007, San Diego, Etats Unis*.
- Lô-Pelzer E, Bousset L, Jeuffroy MH, Salam MU Aubertot JN (soumis). SIPPOM-WOSR: a Simulator for Integrated Pathogen POPulation Management. Case study of phoma stem canker on Winter OilSeed Rape. *Field Crop Research* (soumis)
- Nathaniels NQR, Taylor GS (1983). Latent infection of winter oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Pathology*, **32**, 23-31.
- Nuzum C, Kaldor CJ (1988). Assessment and control of latent infection of rape, *Brassica napus*, by *Leptosphaeria maculans*. *Australasian Plant Pathology*, **17**, 74-8.
- Poisson B, Pérès A (1999). Study of rapeseed susceptibility to primary contamination of *Leptosphaeria maculans* in relation to plant vegetative stage. *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, September 26-29, Canberra, Australia*. <http://www.regional.org.au/au/gcirc/>
- Schmit J, West J, Narcy JP, Roux J, Balesdent MH, Rouxel T, Gout L (2002). La nécrose du collet du colza : analyse de la distribution du champignon dans la plante à l'aide d'outils moléculaires. *Oléagineux Corps gras Lipides*, **9**, 2-3.
- Sun P, Fitt BDL, Gladders P, Welham SJ (2000). Relationships between phoma leaf spot and development of stem canker (*Leptosphaeria maculans*) on winter oilseed rape (*Brassica napus*) in southern England. *Annals of Applied Biology*, **137**, 113-25.
- Sun P, Fitt BDL, Steed JM, Underwood CT, West JS (2001). Factors affecting development of phoma canker (*Leptosphaeria maculans*) on stems of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in southern England. *Annals of Applied Biology*, **139**, 227-42.
- Travadon R, Bousset L, Saint-Jean S, Brun H, Sache I, 2007. Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* **56**, 595-603.
- Travadon R, Marquer B, Ribulé A, Sache I, Brun H, Delourme R, Bousset L, (2008). Systemic progress of *Leptosphaeria maculans* from cotyledons to hypocotyle in oilseed rape: influence of the number of infection sites, of intraspecific competition and of host polygenic resistance. *Plant Pathology* (accepté)
- West JS, Balesdent MH, Rouxel T, Narcy JP, Huang YJ, Roux J, Steed JM, Fitt BDL, Schmit J (2002). Colonization of winter oilseed rape tissues by A/Tox+ and B/Tox0



- Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in France and England. *Plant Pathology*, **51**, 311-21.
- Xi K, Morrall RAA (1993). Histopathology of blackleg development in spring rapeseed. *Journal of Phytopathology*, **137**, 26-32.





### Annexe 3 : Liste des publications scientifiques et communications associées au travail de thèse

#### Publications scientifiques

- Travadon R**, Bousset L, Saint-Jean S, Brun H, Sache I (2007). Splash dispersal of *Leptosphaeria maculans* pycnidiospores and the spread of blackleg on oilseed rape. *Plant Pathology* 56, 595-603.
- Travadon R**, Marquer B, Ribulé A, Sache I, Brun H, Delourme R, Bousset L (2008). Systemic progress of *Leptosphaeria maculans* from cotyledons to hypocotyle in oilseed rape: influence of the number of infection sites, of intraspecific competition and of host polygenic resistance. *Plant Pathology* (acceptée)
- Travadon R**, Sache I, Dutech C, Stachowiak A, Bousset L, (2008). High gene flow and random mating in *Leptosphaeria maculans* populations in France. *Environmental Microbiology* (à soumettre juin 2008).

#### Présentations à des Congrès

##### Communications dans des congrès et colloques internationaux

- Travadon R**, Marquer B, Ribulé A, Sache I, Brun H, Bousset L (2008). Systemic progress of *Leptosphaeria maculans* from cotyledons to the stem of *Brassica napus*. 9<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Turin, Italy, 24-29 August 2008. (Poster)
- Travadon R**, Sache I, Marquer B, Ribulé A, Delourme R, Brun H, Dutech C, Bousset L (2008). Epidemiological Factors Contributing to the Adaptation of *Leptosphaeria maculans* Populations to Specific Resistance Genes in *Brassica napus*: Access to the Site of Sexual Reproduction and Ascospore Dispersal. 5<sup>th</sup> ISHS International Symposium on Brassicas and 16<sup>th</sup> Crucifer Genetics Workshop, Lillehammer, Norway, 8–12h September 2008 (Communication orale)
- Travadon R**, Sache I, Marquer B, Ribulé A, Delourme R, Brun H, Masson JP, Dutech C, Bousset L (2008). Preserving durable resistance to phoma stem canker in oilseed rape: Epidemiological key factors. *ENDURE international conference - Diversifying Crop Protection, October 12-15, La Grande-Motte, France*
- Travadon R**, Sache I, Marquer B, Ribulé A, Delourme R, Brun H, Masson JP, Dutech C, Bousset L (2008). Facteurs épidémiologiques contribuant à l'adaptation des populations de *Leptosphaeria maculans* aux gènes de résistance spécifiques de *Brassica napus*: dispersion des pycnidiospores et des ascospores et progression systémique du champignon. *Colloque Biotechnologies végétales et gestion durable des résistances face à des stress biotiques et abiotiques, 30 juin - 3 juillet 2008 Rennes, France*
- Travadon R**, Bousset L, Saint-Jean S, Brun H, Sache I (2007). Rain-splash is an effective mechanism of dispersal of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) pycnidiospores. 11<sup>th</sup> Rapeseed Congress 26-30 March 2007, Wuhan, China. (Poster)

##### Communications dans des congrès et colloques nationaux

- Travadon R**, Marquer B, Ribulé A, Sache I, Brun H, Bousset L (2008). Etude de la progression systémique de *Leptosphaeria maculans* des infections cotylédonaire aux collets des plantes de colza (*Brassica napus*). *Journées Jean Chevaugnon. Temes Rencontres de Phytopathologie/ Mycologie de la Société Française de Phytopathologie, Aussois, France, 20-24 janvier 2008*. (Poster)
- Travadon R**, Sache I, Brun H, Dutech C, Bousset L (2008). Analyse de la structure génétique spatiale de populations françaises de *L. maculans*, agent du Phoma du



colza. *Journées Jean Chevaugnon. 7emes Rencontres de Phytopathologie/ Mycologie de la Société Française de Phytopathologie, Aussois, France, 20-24 janvier 2008.* (Poster)

**Travadon R**, Sache I, Dutech C, Bousset L, (2008). Estimation des flux de genes entre les populations françaises de *Leptosphaeria maculans*. *Colloque le Petit Pois Déridé, Rennes, France, 25-28 août 2008.*

**Travadon R**, Sache I, Brun H, Bousset L (2006). La pluie disperse efficacement les pycniospores de *Leptosphaeria maculans*, agent du Phoma du colza *Journées Jean Chevaugnon. 6emes Rencontres de Phytopathologie/ Mycologie de la Société Française de Phytopathologie, Aussois, France, 15-19 janvier 2006, 33.* (Communication orale)

#### **Articles à destination du développement**

**Travadon R**, Bousset L, Sache I (2008). Epidémiologie et méthodes de contrôle – Emission des conidies ou pycnidiospores de *L. maculans*. In : Le point sur le Phoma. In Pinochet X (Ed), Quae editions (à paraître en 2008)

Bousset L, **Travadon R**, Schmit J (2008). Epidémiologie et méthodes de contrôle – Progression systémique du champignon dans la plante. In : Le point sur le Phoma. In Pinochet X (Ed), Quae editions (à paraître en 2008)



Facteurs épidémiologiques contribuant à l'adaptation des populations de *Leptosphaeria maculans* aux résistances spécifiques de *Brassica napus*: dispersion des pycnidiospores et des ascospores et progression systémique du champignon.

**Résumé :** La lutte contre le Phoma du colza, causé par le champignon *Leptosphaeria maculans*, repose principalement sur la culture de variétés résistantes dont l'efficacité est peu durable. La reproduction sexuée confère un fort potentiel adaptatif au champignon confronté aux pressions de sélection exercées par les variétés résistantes : elle permet l'acquisition et l'association d'allèles de virulence, alors que les ascospores issues de la reproduction sexuée assurent la transmission de la maladie d'une saison culturale à la suivante. Nous faisons l'hypothèse qu'en début de contournement de résistance, la transmission de la virulence d'une génération à la suivante est limitée d'une part par la faible probabilité de reproduction sexuée entre isolats virulents et d'autre part par une dispersion des ascospores spatialement limitée. Pour tester cette hypothèse nous avons étudié (i) la dispersion des pycnidiospores par la pluie, (ii) la progression systémique du champignon dans la tige de colza et (iii) la structure spatiale des populations de *L. maculans* pour inférer les distances de dispersion des ascospores. Sous un générateur de gouttes en air calme, les pycnidiospores sont dispersées par les gouttelettes de pluie à moins de 40 cm de la macule source ; des résidus porteurs de pycnides peuvent causer des infections primaires de la maladie. Le succès de la phase systémique détecté par l'expression de nécroses au collet sur des plantules inoculées en conditions contrôlées augmente avec le nombre de points d'infection, mais diminue en présence de la résistance partielle ; la compétition entre individus peut limiter la présence concomitante des types sexuels au collet de la plante. Par conséquent, dans des champs avec des populations de *L. maculans* à faible densité, la dispersion des pycnidiospores par la pluie peut accroître la taille de la population pathogène et permettre la rencontre d'individus initialement distants, tandis que la progression systémique du champignon peut limiter la rencontre locale d'isolats virulents sexuellement compatibles. Pour 29 populations françaises génotypées à l'aide de marqueurs minisatellites, l'essentiel de la diversité génotypique est détectée à l'échelle d'une population (champ) ; l'absence de différenciation génétique entre populations distantes n'a pas permis de mettre en évidence une limitation des flux de gènes à l'échelle spatiale analysée. Ces résultats suggèrent que la dispersion du Phoma par les ascospores est beaucoup plus élevée que supposée et/ou que les tailles efficaces des populations du champignon dans une parcelle sont très grandes. Ces connaissances épidémiologiques devront être prises en compte pour améliorer les stratégies de déploiement durable des variétés résistantes.

-----  
Epidemiological factors contributing to the adaptation of *Leptosphaeria maculans* populations to specific resistance in *Brassica napus*: pycnidiospore and ascospore dispersal and fungal systemic growth.

**Abstract:** Management of phoma stem canker of oilseed rape, caused by *Leptosphaeria maculans*, primarily relies on the cultivation of resistant varieties that lack durable efficiency. Sexual reproduction enhances the evolutionary potential of the fungus submitted to the selection pressure exerted by resistant varieties by allowing acquisition and association of virulence alleles and season-to-season transmission of the disease through ascospore dispersal. We hypothesize that for small, emergent virulent populations, sexual reproduction could be restricted by the reduced mating probability of individuals and that season-to-season transmission of virulent individuals through ascospore dispersal can be spatially limited. To test these hypotheses, we investigated (i) rain-splash dispersal of pycnidiospores, (ii) systemic growth of the fungus in stem and (iii) the spatial genetic structure of populations to infer ascospore dispersal distances. Pycnidiospores were splash-dispersed over short distances (within 40 cm from the source) from phoma leaf spots, while oilseed rape stubble carrying pycnidia constituted a potential source of primary infections. Stem canker expression via systemic growth increased with the number of infection sites on cotyledon and decreased on polygenic resistant hosts, while density-dependent competition between isolates was shown. In the field at low *L. maculans* population densities, rain-splash dispersal of pycnidiospores could increase the pathogen population size and enhance sexual reproduction by facilitating the mating of initially spatially distant individuals of opposite mating type, while systemic growth could reduce this mating. From 29 French field populations, most genotypic (minisatellite markers) diversity was found within a single population; the lack of genetic differentiation between populations could not demonstrate restricted gene flow and distances of ascospore dispersal could not be inferred at the spatial scale studied. These results suggest that ascospore dispersal may have a greater range than previously state and/or that effective field population sizes may be very large. These epidemiological findings should be accounted for to improve deployment of resistant varieties.